

**Gustavo Pozza Silveira**

---

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA  
FRENTE À ENZIMA gGAPDH DE DERIVADOS DE  
CARBOIDRATOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE  
NOVAS DROGAS ANTI-CHAGÁSICAS**

---

**Florianópolis – SC**

**2002**

**Gustavo Pozza Silveira**

---

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA  
FRENTE À ENZIMA gGAPDH DE DERIVADOS DE  
CARBOIDRATOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE  
NOVAS DROGAS ANTI-CHAGÁSICAS**

---

Dissertação submetida ao Curso de Pós Graduação em  
Química da Universidade Federal de Santa Catarina como  
parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em  
Química

Orientador: Prof. Dr. Marcus Cesar Mandolesi Sá

**Florianópolis – SC**

**2002**

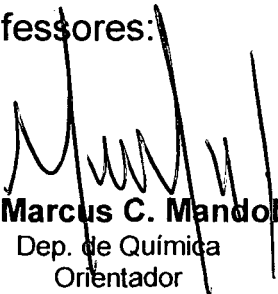
**Gustavo Pozza Silveira**

---

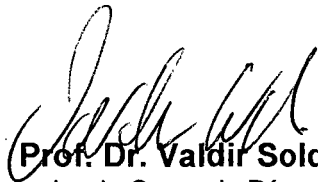
**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA  
FRENTE À ENZIMA gGAPDH DE DERIVADOS DE  
CARBOIDRATOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE  
NOVAS DROGAS ANTI-CHAGÁSICAS**

---

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química no Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela comissão formada pelos professores:




**Prof. Dr. Marcus C. Mandolesi Sá**  
Dep. de Química  
Orientador




**Prof. Dr. Valdir Soldi**  
Coordenador do Curso de Pós-graduação  
em Química

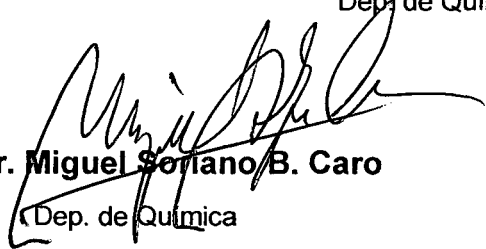
Banca Examinadora



**Prof. Dr. César Zucco**  
Dep. de Química



**Prof. Dr. Antônio Carlos Joussef**  
Dep. de Química



**Prof. Dr. Miguel Soriano B. Caro**  
Dep. de Química

**Dedico este trabalho aos meus pais  
Silveira e Dona Eunice, por todas  
lições de amor e carinho a mim  
passadas.**

***Todo saber e todo aumento  
de nosso saber, em vez de  
terminar em uma solução, dá  
antes início a nova dúvida.  
Aumentar o saber significa  
aumentar as dúvidas. E a  
cada resposta nova pergunta  
se segue.***

***(Hermann Hesse)***

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Marcus Cesar Mandolesi Sá, pelos momentos de entusiasmo através dos quais passamos durante inúmeras discussões, quando necessitávamos separar a grande amizade formada da hierarquia natural existente entre professor e aluno; pela excelente orientação prestada ao longo destes dois anos que estivemos juntos; pelas lições de organização que sem dúvida contribuíram muito para minha formação e o sucesso deste trabalho;
- Aos companheiros de grupo Luciano, Rodrigo, Natália, e de laboratório Prof. Joussef, Emerson (alemão), Tatiana (Paulinha), Luciana, Bigode, Mora, Villa, Prof. Ricardo, Kely, Carol pelos inúmeros bons momentos que passamos, pela grande amizade e união estabelecida entre todos nós;
- Aos funcionários da central de análises, pelas análises de RMN e IV;
- A todos os meus amigos que sempre me apoiaram: Alzete, Jerusa, Leila, Fernanda, Leonardo Morello, Ale, Lia, Rafaela, Renata Ruzzi, Glorinha, Prof<sup>a</sup>. Rosana, Prof<sup>a</sup>. Marilene e companheiros da A.R.L.S. Fênix do Sul;
- Aos meus companheiros de festa: Cristian, Ricardo, Gustavo Fontes, Rico, Leonardo (mestre faixa preta) e Cristiano (cojaque) Studzinski, Felipe (cimon), Murilo, Juliano Rossi, Ricardo (gaúcho), Gustavo (muzzy), Jorge (CeWerino), Fernando Maluf, galera do C.A.S.G., galera da Dinâmica, pelas incontáveis manguassadas que enfrentamos juntos;
- À CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado;
- A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Curso de Pós-Graduação em Química pela oportunidade;
- À minha Família;
- Ao G.A.D.U.

## SUMÁRIO

### ÍNDICE ANALÍTICO

<b>1 INTRODUÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>1</b>
1.1 Caracterização do problema .....	1
1.2 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	2
1.3 Planejamento racional de fármacos .....	4
1.4 Seleção de moléculas como possíveis inibidores da enzima alvo GAPDH. ....	6
1.5 Carboidratos .....	8
1.5.1 <i>D-ribolactona como precursor quiral para a síntese de             produtos naturais</i> .....	9
1.6 Justificativas .....	13
<b>2 OBJETIVOS E METAS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>16</b>
3.1 Síntese dos derivados peracilados .....	16
3.1.1 <i>Análises espectroscópicas dos derivados peracilados ...</i>	17
3.2 Síntese de derivados da D-ribonolactona seletivamente substituídos .....	20
3.2.1 <i>Síntese dos derivados da D-ribolactona seletivamente             substituídos na posição 5-</i> .....	20
3.2.1.1 Preparação de compostos 5-acilados via controle estequiométrico .....	22
3.2.1.2 Preparação de compostos 5-acilados em três etapas .....	22
3.2.1.2.1 <i>Preparação da isopropilideno lactona 16</i> .....	23
3.2.1.2.2 <i>Síntese os derivados 5-acil-2,3-isopropilideno-D-                     ribonolactona</i> .....	25
3.2.1.2.3 <i>Hidrólise do grupo isopropilideno</i> .....	28

3.2.2 Síntese dos derivados da <i>D</i> -ribolactona seletivamente substituídos na posição 2- .....	31
3.2.2.1 Preparação dos derivados 5-acil-3,4-benzilideno- <i>D</i> -ribonolactona .....	36
3.2.2.2 Hidrólise do grupo benzilideno.....	39
3.2.2.3 Procedimento alternativo para preparação de derivados seletivamente acilados na posição 2- .....	53
3.3 Desenvolvimento de moléculas candidatas a fármacos .....	58
3.3.1 Ensaios biológicos.....	58
PARTE EXPERIMENTAL.....	66
4.1 Instrumentação e reagentes .....	66
4.2 Sínteses dos derivados da <i>D</i> -ribolactona .....	67
4.2.1 Síntese dos derivados peracilados.....	67
4.3 Síntese dos derivados acilados na posição 5- .....	69
4.3.1 2,3-Isopropilideno- <i>D</i> -ribolactona 16.....	69
4.3.2 5- <i>O</i> -acil-2,3-isopropilideno- <i>D</i> -ribolactona .....	70
4.3.3 5- <i>O</i> -acil- <i>D</i> -ribolactona .....	72
4.4 Acilações seletivas nas posições 2- e 3-.....	75
4.4.1 3,4- <i>O</i> -( <i>R</i> )-benzilideno- <i>D</i> -ribono-1,5-lactona 24.....	75
4.4.2 2- <i>O</i> -acil-3,4- <i>O</i> -( <i>R</i> )-benzilideno- <i>D</i> -ribono-1,5-lactona .....	76
4.4.2.1 2- <i>O</i> -acil e 3- <i>O</i> -acil- <i>D</i> -ribolactonas.....	78
4.4.2.1.1 2,5-di- <i>O</i> -acetil-3- <i>O</i> -benzoil e 3,5-di- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -benzoil- <i>D</i> -ribolactona .....	79
4.4.2.1.2 tri- <i>O</i> -benzoil a partir da mistura de isômeros 2- <i>O</i> -benzoil e 3- <i>O</i> -benzoil- <i>D</i> -ribolactona .....	80
4.5 Acilações seletivas nas posição 2' e 3' (Rota alternativa).....	80
4.5.1 2,5-di- <i>O</i> -acetil-3- <i>O</i> -(4-nitrobenzoil) e 3,5-di- <i>O</i> -acetil-2- <i>O</i> -(4'-nitrobenzoil)- <i>D</i> -ribolactona .....	81
5 CONCLUSÃO .....	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Vista lateral do barbeiro fazendo uma refeição sanguínea e excretando. ....	3
Figura 2 - Fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (GAP) para 1,3-Difosfoglicerato (DPG) a partir da catálise com GAPDH. ....	4
Figura 3 - Representação 3D da estrutura da enzima GAPDH glicossomial. ....	6
Figura 4 - Derivados de nucleosídeos sintetizados como inibidores da TcGAPDH. ....	7
Figura 5 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para o composto 2,3,5-tri-O-(4'-cloro-benzil)-D-ribono-1,4-lactona 37. ....	18
Figura 6 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para o composto 2,3-isopropilideno-5-O-(4'-nitrobenzil)-D-ribono-1,4-lactona 55. ....	26
Figura 7- Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para o composto 5-O-benzil-D-ribono-1,4-lactona 60 em DMSO-d <sub>6</sub> . ....	29
Figura 8 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H em DMSO e D <sub>2</sub> O para o composto 5-O-benzil-D-ribono-1,4-lactona 60. ....	30
Figura 9 - À esquerda: derivado 68 que teve sua estrutura elucidada por difração de raio-X. À direita: estrutura proposta por Zinner. ....	33
Figura 10 - ORTEP para o composto 3,4-O-(R)-benzilideno-2-O-(4'-nitrobenzil)-D-ribono-1,5-lactona 62. ....	37
Figura 11 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para o composto 3,4-O-(R)-Benzilideno-2-O-(4'-metoxibenzoil)-D-ribono-1,5-lactona 88. ....	38
Figura 12 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para a banda 3 (enriquecida no isômero 2). ....	41
Figura 13 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para a banda 1 (enriquecida no isômero 1). ....	41
Figura 14 - Possíveis isômeros para reação de 67 com TFA aquoso 67%. ....	42
Figura 15 – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> , para a acetilação da mistura de isômeros 90 e 93 numa proporção de 6:1. ....	45
Figura 16 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> , para a acetilação da mistura de isômeros 90 e 93 numa proporção de 1:5. ....	45
Figura 17 - Compostos formados a partir da reação entre 67 e TFA 67%. ....	47
Figura 18 - Espectros obtidos para a hidrólise do grupo benzilideno de 67 em tubo de RMN. ....	49
Figura 19- Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para a reação de 67 e TFA aquoso 67%, sem maiores tratamentos. ....	52
Figura 20 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para a reação entre 87 e TFA aquoso 67%, sem maiores tratamentos. ....	52
Figura 21 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para a reação entre 88 e TFA aquoso 67%, sem maiores tratamentos. ....	52
Figura 22 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para a mistura de isômeros 101 e 103. ....	55
Figura 23 – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H para acetilação da mistura de isômeros 105 e 106. ....	57

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Rota sintética para a síntese da (–)-(R)-angélica lactona 5, (+)-(R)-angélica lactona 6 e (S)-hidroximetil-2(5H)-furanona 7.....	9
Esquema 2 - Síntese de (+)-blastimicinona 8.....	10
Esquema 3 - Rota sintética para síntese da (+)-eldanolida 11. Exemplo de molécula contendo um padrão (4S,5R)-4,5-dialquildiidro-2-(3H)-furanona: (+)-trans-conhaque lactona 12. ....	10
Esquema 4 - Síntese da (–)-(S)-umbelactona 15.....	11
Esquema 5 - Síntese da (+)-lineatina 17. ....	11
Esquema 6 - Síntese da (+)-citroviral 19.....	11
Esquema 7 - Síntese da (–)-Neplanocina C 20, Neplanocina A 21, e Aristomicina 22. ....	12
Esquema 8 - Síntese da Maitansinoide 23.....	12
Esquema 9 - Síntese do diidroxiprolina 28 a partir de derivados da D-ribonolactona.....	13
Esquema 10 - Derivados da D-ribono-1,4-lactona como inibidores da arabinose 5-fosfato isomerase.....	13
Esquema 11 - Síntese de inibidores seletivos da enzima GAPDH de <i>T. cruzi</i> . .	15
Esquema 12 - Síntese do derivado tri-cinamoil-D-ribonolactona 40.....	17
Esquema 13 - Ester sintetizado seletivamente na posição 5-.....	20
Esquema 14 - Síntese de derivados alquil substituídos na posição 5- da D-ribonolactona 3.....	21
Esquema 15 - Tentativa de síntese seletiva da posição 5- da D-ribonolactona 3. ....	21
Esquema 16 – Tentativa de acilação direta da posição 5. ....	22
Esquema 17 - Rota sintética para preparação dos derivados mono acilados na posição 5-.....	22
Esquema 18 - Possíveis estruturas em condições de equilíbrio para a migração do grupo acetal da lactona de 5 e 6 membros.....	24
Esquema 19 - Estruturas determinadas por difração de Raio-X para o grupo acetal da lactona de 5 e 6 membros. ....	24
Esquema 20 - Síntese dos derivados 5-acil-2,3-isopropilideno. ....	25
Esquema 21 - Acetilação do derivado 2,3-isopropilideno D-ribonolactona 16. .	25
Esquema 22 - Esquema geral para síntese dos derivados 5-acilados.....	31
Esquema 23 - Síntese da azida 66 seletivamente substituída na posição 2- da D-ribonolactona 3.....	32
Esquema 24 - Estratégia para a preparação dos derivados 2-acilados da D-ribonolactona via intermediário 24. ....	32
Esquema 25 – formação do grupo acetal a partir dos hemiacetais 72-74.....	33
Esquema 26 – Rotâmeros transóide 77 e cisóide 78 do íon oxônio 74. ....	34
Esquema 27 - Possíveis intermediários para a formação da 3,4-O-(R)-benzilideno-D-ribono-1,4- lactona 24.....	34
Esquema 28 - Possíveis intermediários para a formação da 3,4-O-(R)-benzilideno-D-ribono-1,4- lactona 24.....	35

Esquema 29- Hidrólise do grupo benzilideno de 67.....	40
Esquema 30 - Síntese dos derivados acetilados 99 e 100.....	44
Esquema 31 - Síntese do derivado 35 a partir dos isômeros 90 e 93. ....	47
Esquema 32 - Reação de hidrólise realizada em tudo de RMN. ....	48
Esquema 33 - Mecanismo proposto para hidrólise do grupo benzilideno seguido de migração do grupo acil. ....	51
Esquema 34 - Síntese dos derivados 101 e 103 por uma rota alternativa.....	54
Esquema 35 - Síntese dos derivados acilados dos isômeros 101 e 103. ....	56

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Derivados peracilados 35-39 e seus respectivos substituintes R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> . .....	16
Tabela 2 – Deslocamento Químico $\delta$ (ppm) para os hidrogênios dos compostos peracilados 35-40. ....	19
Tabela 3 - Derivados 5-O-acil-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona 54-58, seus respectivos substituintes R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> , e rendimentos reacionais. ....	25
Tabela 4 - Deslocamento Químico $\delta$ (ppm) para os hidrogênios dos compostos 16, 54-58 hidrogênios do anel da lactona em CDCl <sub>3</sub> . ....	27
Tabela 5 - Derivados 5-O-acil-D-ribono-1,4-lactona 60-64 e seus respectivos substituintes R <sub>1</sub> e rendimentos reacionais. ....	28
Tabela 6 - Descolamento Químico $\delta$ (ppm) para os hidrogênios do anel da lactona em DMSO, para os compostos 60-64. ....	30
Tabela 7 - Derivados 67,87-89 e seus respectivos substituintes R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> . ....	36
Tabela 8 - IV das carbonilas de éster e de $\gamma$ - e $\delta$ -lactonas. ....	37
Tabela 9 - Deslocamento químico ( $\delta$ , ppm) dos hidrogênios do anel lactona em DMSO-d <sub>6</sub> (24,88) e CDCl <sub>3</sub> (67,87,89). ....	39
Tabela 10 - Bandas de isômeros obtidas a partir das frações da coluna cromatográfica de sílica gel . ....	40
Tabela 11 - Hidrogênios do anel da lactona para as diferentes frações da coluna de sílica gel para a reação de hidrólise do grupo benzilideno do composto 67. ....	43
Tabela 12 - Sinais de maior intensidade para o anel da lactona dos derivados 90, 93, 99 e 100. ....	46
Tabela 13 - Derivados e seus respectivos substituintes R. ....	53
Tabela 14 - Protóns referentes ao anel da lactona dos isômeros 101 e 103. ....	56
Tabela 15 - Hidrogênios do anel da lactona para os compostos 101, 103, 105, 106. ....	57
Tabela 16 - Testes de inibição da enzima gGAPDH ( <i>T. cruzi</i> ) para os derivados de carboidratos comerciais. ....	60
Tabela 17 - Testes de inibição da enzima gGAPDH ( <i>T. cruzi</i> ) para os derivados de carboidratos 35-40. ....	61
Tabela 18 - Testes de inibição da enzima gGAPDH ( <i>T. cruzi</i> ) para os derivados de carboidratos 16,54-59. ....	62
Tabela 19 - Testes de inibição da enzima gGAPDH ( <i>T. cruzi</i> ) para os derivados de carboidratos 60-64. ....	63
Tabela 20 - Testes de inibição da enzima gGAPDH ( <i>T. cruzi</i> ) para os derivados de carboidratos. ....	63
Tabela 21 - Testes de inibição da enzima gGAPDH ( <i>T. cruzi</i> ) para os derivados de nucleosídeos. ....	64
Tabela 22 - Derivados 2,3,5-tri-O-acil-D-ribono-1,4-lactona e seus respectivos substituintes R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> . ....	67
Tabela 23 - Derivados 5-O-acil-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona e seus respectivos substituintes R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> . ....	70

Tabela 24 - Derivados 5-O-acil-D-ribono-1,4-lactona 46-49 e seus substituintes R.....	72
Tabela 25 - Derivados 2-O-acil-3,4-O-( <i>R</i> )-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona 77-80 e seus respectivos substituintes R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> . ....	76
Tabela 26- Derivados 2-acil e 3-O-acil-D-ribono-1,4-lactona e seus respectivos substituintes R. ....	78

## SIGLAS E ABREVIATURAS

AcOH – Ácido acético;

Brine – Solução de cloreto de sódio;

COSY – Espectroscopia 2D acoplada (hidrogênio - hidrogênio);

RMN-<sup>1</sup>H – Ressonância Magnética nuclear de hidrogênio;

RMN-<sup>13</sup>C – Ressonância Magnética nuclear de carbono 13;

ETOH - Etanol;

MeOH – Metanol;

IV – Espectroscopia na região infravermelho;

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase;

gGAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase glicosossomial;

tbGAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase do *Trypanossoma brucei*;

tcGAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase do *Trypanossoma cruzi*;

m – Multiplete;

d – Dublete;

t – Tripleto;

dd – Duplo duplete;

s – Singleto;

δ – Deslocamento químico;

IC<sub>50</sub> – Concentração necessária para 50% de inibição enzimática;

Py – Piridina;

TFA – Ácido trifluoroacético;

DMF – N,N'-dimetil formamida;

DMSO – Dimetil sulfóxido;

CCD – Cromatografia em camada delgada.

## RESUMO

O presente trabalho apresenta uma nova metodologia para preparação de derivados da D-ribonolactona seletivamente acilados na posição 5-, em três etapas, utilizando condições reacionais simples, reagentes baratos e acessíveis, e em bons rendimentos globais (35-55%).

Foram desenvolvidos estudos de RMN-<sup>1</sup>H a fim de buscar entendimentos para a formação de isômeros 2- e 3-acilados a partir da lactona de Zinner para D-ribonolactona, onde observou-se que a isomerização ocorre de forma rápida e que a proporção isomérica entre os compostos é dependente da reatividade do grupamento acil.

Foi desenvolvida ainda uma metodologia alternativa para a síntese dos compostos 2- e 3-acilados via intermediário estanilado.

Os derivados da ribose apresentados nesta dissertação, bem como um conjunto de derivados da tioguanosina, foram avaliados frente a inibição da enzima TbGAPDH glicossomial visando o desenvolvimento de novas drogas anti-chagásicas. A atividade inibitória encontrada para os derivados de carboidratos foram baixas a moderadas, sendo que os adutos peracilados foram os compostos que mostraram melhores resultados. Já os derivados de nucleosídeos apresentaram os maiores valores de inibição da enzima alvo, entre os compostos testados.

## ABSTRACT

We presented the development of new methodologies for the synthesis of carbohydrate derivatives selectively substituted at 2-, 3- and 5- positions using inexpensive reagents, simple conditions and reasonable overall yields.

The 5-acylated derivatives were readily obtained in a three-step procedure involving 2,3-diol group protection of commercially available  $\gamma$ -ribonic lactone, followed by 5-acylation with acyl chloride in pyridine and subsequent acidic 2,3-deprotection (35-55% overall yields).

Studies by  $^1\text{H-NMR}$  were developed in an attempt to understand the formation of 2- and 3-acyl isomers of D-ribonolactone from Zinner lactone. We observed that the isomerization of 2- and 3-acyl isomers is fast and their rates are dependent on the reactivity of the acyl group.

An alternative route to the synthesis of 2- and 3-acyl compounds is also developed by means of stannylated intermediary.

In an ongoing program toward the synthesis of nucleosides and carbohydrates as inhibitors of trypanosomal gGAPDH enzyme, ribose derivatives and some thioguanosine derivatives were synthesized in order to evaluate their inhibitory activities. The activities for the carbohydrate derivatives were lower to moderate and the peracylated derivatives showed better results for this class of compounds. The peracylated thioguanosines gave the highest inhibition value for target enzyme within the tested compounds.



são encontradas três formas básicas. A forma *tripomastigota* é a mais alongada, e tem por característica a incapacidade de divisão extracelular. É altamente especializada em infectar as células do hospedeiro vertebrado. A forma *epimastigota* tem grande potencial de divisão no hospedeiro invertebrado (o barbeiro), mas é incapaz de infectar o hospedeiro vertebrado. A terceira forma do *T. cruzi* é arredondada, apresentando um flagelo curto, com pouca mobilidade, sendo chamada de *amastigota*. É a forma característica encontrada no hospedeiro vertebrado, apresentando um alto potencial de divisão celular.<sup>3</sup>

O ciclo de vida e propagação do *T. cruzi* ocorre da seguinte maneira: o inseto-vetor alimenta-se de sangue contendo o parasita na forma *tripomastigota*, transformando-se em *epimastigota* e multiplicando-se no interior do barbeiro. Passadas 3 a 4 semanas, após inúmeras multiplicações e nova transformação para *tripomastigota* (forma infecciosa do hospedeiro vertebrado), o parasita aloja-se no intestino do vetor, aguardando uma nova refeição do inseto e possível excreção, quando um novo hospedeiro vertebrado poderá ser infectado, através da mucosidade superficial, conjuntiva (olhos), ou por orifícios na pele (arranhões, ou na própria picada do barbeiro). Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, o parasita em sua forma *tripomastigota* pode ser fagocitado por macrófagos ou ainda penetrar diretamente nas células, onde são transformados em *amastigotas*, que após vários ciclos de multiplicação, transformam-se novamente em *tripomastigotas*. A célula hospedeira então rompe-se, liberando o parasita nos tecidos adjacentes e na circulação sanguínea. O ciclo completa-se quando *tripomastigotas* presentes na circulação do hospedeiro vertebrado são ingeridos numa nova refeição sanguínea por outro inseto-vetor e transformados em *epimastigotas* no seu interior.<sup>8</sup>



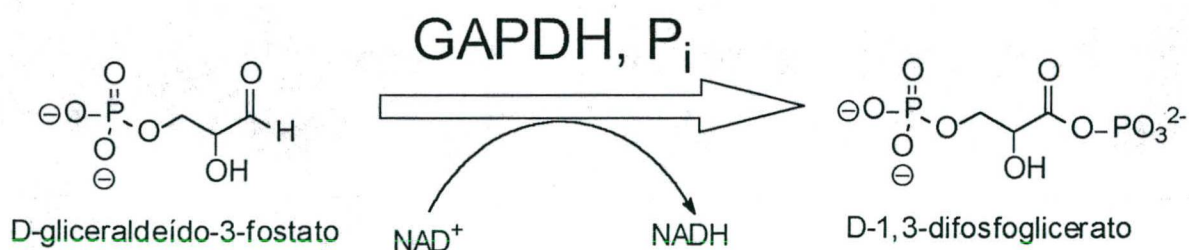
**Figura 1- Vista lateral do barbeiro fazendo uma refeição sanguínea e excretando.**

### 1.3 Planejamento racional de fármacos

A técnica de planejamento racional de fármacos, baseado em estruturas tridimensionais de proteínas, tem sido utilizada mundialmente por vários grupos de pesquisa e também por companhias farmacêuticas, na busca por substâncias ativas biologicamente.<sup>4,9-16</sup> Essa nova metodologia permite o acesso mais rápido e mais eficiente a compostos que são potencialmente aptos ao desenvolvimento, até tornarem-se drogas mais efetivas e seguras. É uma técnica que se baseia na inibição ou estimulação da atividade biológica de macromoléculas (proteínas e ácidos nucleicos), responsáveis por várias doenças. O planejamento racional de fármacos emprega tecnologia de ponta na área de Química Medicinal, como cristalografia de Raio-X de proteínas, biologia molecular, química combinatória, modelagem molecular e ensaios biológicos de alta eficiência.

Em 1977, Oppenheimer e Borst descobriram que na corrente sanguínea dos parasitas da família *Trypanosomatidae* existe uma organela, o glicossoma, que é responsável pela glicólise. Estes parasitas não possuem um ciclo de Krebs funcional,<sup>14</sup> sendo, portanto, extremamente dependentes da glicólise para a produção de ATP. Esta observação sugere que as enzimas glicolíticas sejam alvos atrativos para o desenho de drogas tripanocidas.

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomial (gGAPDH) é um homotetrâmero de massa molecular aproximadamente 156 kDa, formada por quatro sub-unidades, cada qual apresentando duas funções: a função  $\text{NAD}^+$  ou N-terminal e a função catalítica ou C-terminal. Esta enzima é responsável pela catálise da fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (GAP) para 1,3-difosfoglicerato (DPG) (Figura 2).<sup>14</sup>



**Figura 2 - Fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (GAP) para 1,3-Difosfoglicerato (DPG) a partir da catálise com GAPDH.**



Verlinde *et al*,<sup>4,12,13,16</sup> vêm sintetizando moléculas como inibidores da enzima gGAPDH de *T. brucei* e *L. mexicana*, em busca de novos fármacos para a doença do sono.

Devido a grande proximidade entre as estruturas das GAPDHs do *T. cruzi* e *T. brucei* (90% semelhantes)<sup>14</sup>, Oliva *et al* propuseram que a *T. cruzi* GAPDH (TcGAPDH) poderia ser utilizada para a busca computacional de inibidores específicos para a doença de Chagas.<sup>14</sup>

O sítio catalítico (ou C-terminal) das GAPDHs é composto pela região que envolve a porção nicotinamida do cofator NAD<sup>+</sup> e os resíduos que participam da catálise. Esta região das GAPDHs ainda não foi explorada no desenho racional de novos fármacos.<sup>14</sup>

No sítio ligante do cofator NAD<sup>+</sup> (ou N-terminal) das GAPDHs, duas regiões são consideradas atrativas para o desenho de inibidores específicos. Em uma delas, a presença dos resíduos Leucina e Glicina na *T. brucei* GAPDH (TbGAPDH), resulta em diferenças de polaridade e volume, quando comparados com o correspondente resíduo na enzima humana. Baseado nestes fatos, compostos derivados da adenosina foram desenhados a fim de explorar essas desigualdades.<sup>4,12,13,16</sup> Oliva *et al*<sup>14</sup> determinaram que nesta região, a estrutura da TcGAPDH é conservada com relação à estrutura de GAPDH *T. brucei* (TbGAPDH) e, portanto, esta poderia ser um bom sítio para o desenho de inibidores específicos.

A outra região do sítio ligante do cofator NAD<sup>+</sup>, também considerada interessante para o estudo computacional de novas drogas inibidoras de GAPDH, é a interface formada por duas unidades vizinhas na parte ativa do tetrâmero, que também está próxima ao sítio de ligação da porção adenosina do cofator NAD<sup>+</sup>. Nesta região, uma cavidade hidrofóbica de 10 Å de largura é formada na enzima do *T. brucei*, devido à presença do aminoácido Prolina, enquanto que a enzima homóloga humana não apresenta este espaço.<sup>14</sup> Os resíduos que participam deste sítio na TcGAPDH são Metionina, Valina e Ácido Aspartico, enquanto na homóloga humana são encontrados Phenilalanina, Prolina, Isoleucina.

Por sua vez a TcGAPDH apresenta cavidade similar a TbGAPDH com 9 Å de largura,<sup>14</sup> levando a crer que derivados destes nucleosídeos poderiam fornecer interessantes resultados de inibição e seletividade.<sup>14,17,18</sup>

Portanto, compostos que preencham o sítio de ligação  $\text{NAD}^+$ , e ainda apresentem substituintes volumosos capazes de explorar a cavidade hidrofóbica adjacente na enzima do parasita, possibilitando interações favoráveis com TcGAPDH, mas reduzida afinidade com GAPDH humana, podem fornecer resultados promissores quanto à seletividade na inibição. Desta forma, derivados da adenosina vêm sendo sintetizados e avaliados com relação às enzimas de *T. brucei* e *L. mexicana*, demonstrando bons resultados de seletividade quando comparados com a enzima humana.<sup>14</sup>



Figura 3 - Representação 3D da estrutura da enzima GAPDH glicossomial.

#### 1.4 Seleção de moléculas como possíveis inibidores da enzima alvo GAPDH.

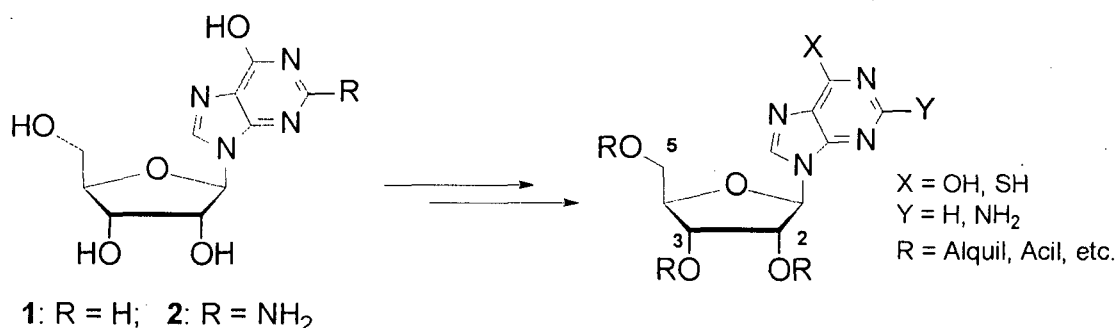
Como foi comentado na seção 1.3, existem diferenças significantes entre as enzimas GAPDHs humana e tripanosomial. Estas diferenças estão de acordo com a observação de que a afinidade da gGAPDH pelo  $\text{NAD}^+$  é 5-10 vezes menor do que a respectiva enzima encontrada nos seres humanos.<sup>14</sup> Este fato foi de suma importância para o objetivo de sintetizar moléculas baseadas no desenho de inibidores seletivos da enzima gGAPDH.

Desta forma, grupos de compostos foram selecionados pelo método de busca computacional utilizando o programa DOCK 3.5,<sup>17,18</sup> destacando-se alguns

derivados dos nucleosídeos inosina **1** e guanosina **2** (Figura 4) como candidatos a inibição seletiva da enzima TcGAPDH.

O programa DOCK é um software computacional em 3D que utiliza parâmetros estéricos e eletrônicos para mapear a topografia do sítio ativo de uma enzima, identificando os aminoácidos envolvidos no reconhecimento molecular de ligantes. A partir de um banco de dados hipotético contendo as propriedades conformacionais de compostos estruturalmente diversos, o programa pontua e classifica cada um desses possíveis inibidores com base nas forças intermoleculares envolvidas entre a enzima e os grupos farmacofóricos presentes no ligante, como ligações-hidrogênio e interações iônicas, dipolares e hidrofóbicas.

Os compostos **1** e **2** são comercialmente disponíveis e foram empregados na preparação de um grupo representativo de nucleosídeos. Todos os derivados sintetizados foram posteriormente submetidos aos testes de inibição enzimática frente à enzima alvo.<sup>17,18,19,20</sup>



**Figura 4 - Derivados de nucleosídeos sintetizados como inibidores da TcGAPDH.**

Os resultados apresentados por estes nucleosídeos mostraram porcentagens de inibição de gGAPDH moderadas. Alguns destes derivados como os triacil inosina (X=OH; Y=H); (Acil = 4'-ClBz; 3',5'-diNO<sub>2</sub>Bz) exibem resultados de 30-50% de inibição em concentração na faixa de 150-200 µM. Já os derivados triaciltioinosina aumentaram a atividade inibitória uma a duas vezes, sendo que o composto tribenzoiltioinosina destaca-se como o mais ativo (IC<sub>50</sub> = 82 µM). Entretanto, o derivado triacetiltioinosina não apresentou atividade inibitória, sugerindo que apenas a presença do grupo tiol no anel purina não é suficiente para a atividade observada para tribenzoiltioinosina. De fato, nucleosídeos que não possuem grupos aril nas posições 2- e 3- também não apresentaram inibição frente à gGAPDH. Outras

modificações no anel purina também não resultaram em aumento da atividade inibitória.

A presença de grupos aril nos derivados de nucleosídeos parece ser necessária para que a atividade inibitória seja observada, sugerindo que estes grupos aromáticos devam possuir uma maior complementaridade estereoeletrônica com o sítio ativo da enzima. Além disso, constata-se que a presença de um grupo tiol no anel purínico, como exposto acima, aumenta uma a duas vezes a atividade inibitória. Estas observações de caráter estrutural orientaram um tratamento preliminar envolvendo a modelagem molecular desses inibidores no sítio ativo da enzima.<sup>17,18</sup>

Este estudo computacional indicou que a presença de um grupamento aromático na posição 3- pode levar a uma maior interação entre o substrato e o sítio ativo da enzima, através da ocupação de um espaço relativamente vago neste sítio, de caráter hidrofóbico. Por outro lado, um substituinte volumoso na posição 2- parece representar interações estéricas desfavoráveis com o sítio ativo de gGAPDH, já que não existe espaço suficiente para que o grupamento aromático se acomode.

De um modo geral, portanto, os dados obtidos a partir de modelagem molecular indicam que um inibidor contendo apenas um grupo aril na posição 3- (e não em 2-) levaria a um aumento das interações enzima-ligante (e, por consequência, um aumento da atividade inibitória).<sup>17,18</sup>

## 1.5 Carboidratos

Embora durante muito tempo os carboidratos tenham sido vistos somente como moléculas biologicamente inertes, responsáveis unicamente pela proteção da superfície celular. Esta diversa classe de biomoléculas é atualmente reconhecida por apresentar importantes funções em numerosos sistemas fisiológicos.<sup>21</sup>

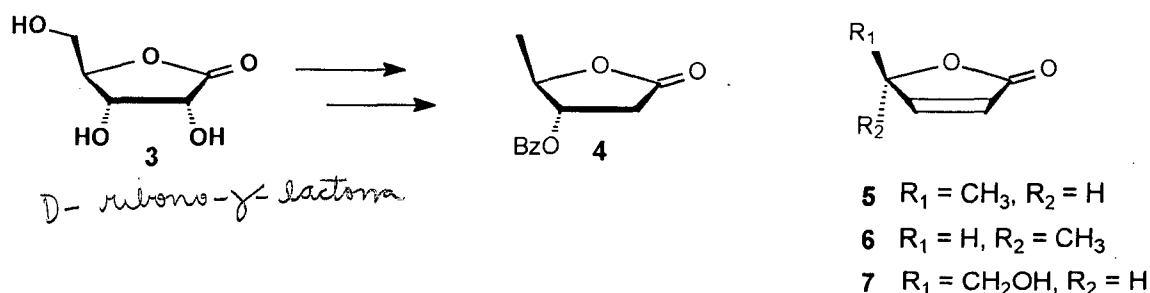
Alguns carboidratos de baixa massa molecular podem ser obtidos em estado altamente puro e em largas quantidades comerciais. Seu baixo custo, abundância natural e facilidade com que podem ser obtidos em alta pureza, estão entre as mais importantes características que tornam os carboidratos importantes fontes quirais de compostos para a construção de moléculas que apresentam atividade biológica.<sup>22</sup>

### 1.5.1 D-ribolactona como precursor quiral para a síntese de produtos naturais

Um problema frequentemente associado com a utilização de carboidratos em síntese é a necessidade de protocolos para proteção e desproteção de grupos funcionais, especialmente no centro anomérico. Essa dificuldade pode ser contornada mantendo o centro anomérico em seu maior estado de oxidação, ou seja, como uma função lactona. Entre as aldonolactonas a D-ribonolactona **3** (outros nomes: D-ribono- $\gamma$ -lactona, D-ribonolactona) é provavelmente a mais intensamente utilizada em síntese orgânica (Esquema 1). Além disso, a D-ribono-1,4-lactona **3** é disponível comercialmente e, portanto, fornece uma interessante alternativa para utilização de açúcares simples na síntese de outras  $\gamma$ -lactonas quirais.<sup>23</sup> A sua química e utilidade foi recentemente revisada.<sup>23,24</sup>

Butenolidas derivados da D-ribonolactona **3**, possuindo um único carbono quiral, são constantemente empregados para induzir assimetria.<sup>24</sup> Numerosos procedimentos para a preparação de butenolidas vêm sendo desenvolvidos a partir da D-ribono-1,4-lactona **3**. Estes compostos têm sido empregados como convenientes precursores quirais para a síntese de lignanas com atividade antileucêmica, como (+)-*trans*-burseran, (-)-isostegana e (+)-esteganacina.<sup>24</sup>

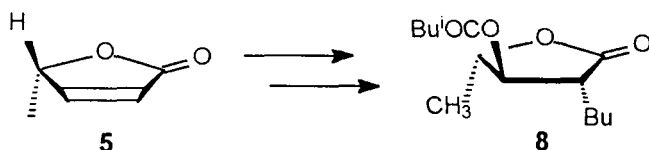
A lactona **4** foi obtida a partir da D-ribono-1,4-lactona **3** em 3 etapas (Esquema 1).<sup>25</sup> Tratamento de **4** com amônia em metanol forneceu (-)-(*R*)-angélica lactona **5**. De maneira similar, Font *et al*<sup>26</sup> sintetizaram (+)-(*R*)-angélica lactona **6**, e Danilova *et al*<sup>27</sup> obtiveram a (*S*)-hidroximetil-2(5*H*)-furanona **7**, produto idêntico ao obtido pela hidrólise enzimática da ranunculina, um glicosídeo presente em espécies da família *Ranunculaceae*. Uma eficiente rota sintética para a síntese da (-)-ranunculina, via **3**, foi descrita por Font *et al*<sup>28</sup> (Esquema 1).



Esquema 1 - Rota sintética para a síntese da (-)-(*R*)-angélica lactona **5**, (+)-(*R*)-angélica lactona **6** e (*S*)-hidroximetil-2(5*H*)-furanona **7**.



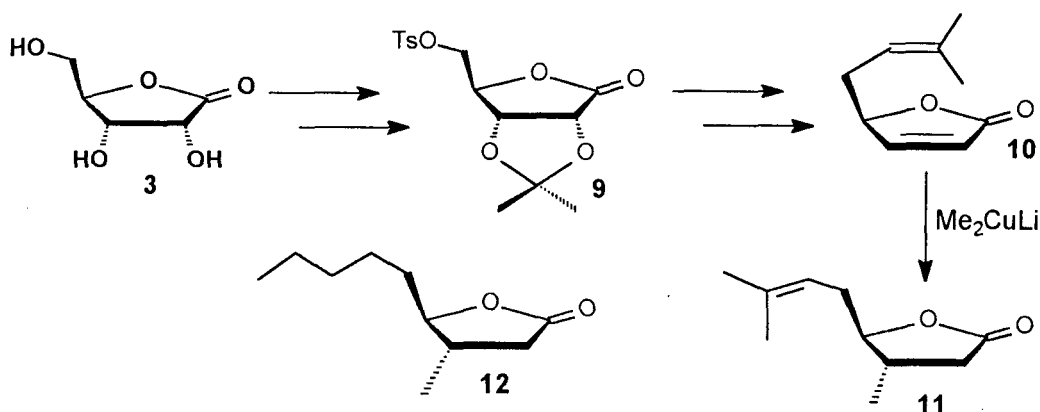
As angélicas lactonas **5** e **6** também têm servido como material de partida quiral para a síntese de moléculas assimétricas como (+) e (-)-blastimicinona **8** (Esquema 2).<sup>24</sup>



Esquema 2 - Síntese de (+)-blastimicinona **8**.

A reação entre butenolidas substituídas e alquil cupratos tem sido investigada a fim de se obter moléculas constituídas do padrão (4*S*,5*R*)-4,5-dialquildiidro-2-(3*H*)-furanona. Produtos naturais possuindo tal estrutura, como por exemplo (3*S*,4*R*)-(+)-eldanolida **11** e (+)-*trans*-conhaque lactona **12**, foram sintetizados.<sup>24</sup>

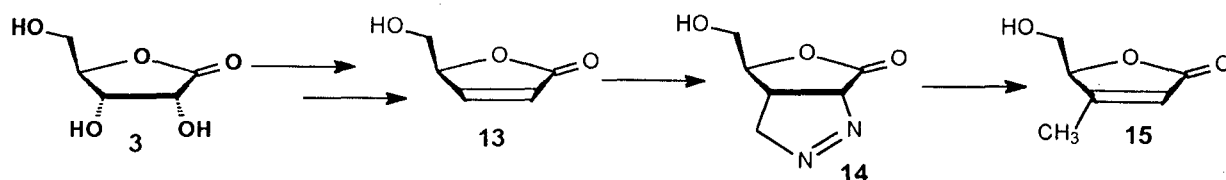
A síntese total da (+)-eldanolida **11**, um feromônio de atração sexual, foi reportada por Font *et al.*<sup>24</sup> (Esquema 3). O composto **11** foi sintetizado por duas rotas diferentes, ambas envolvendo a butenolida **10** como precursor.



Esquema 3 - Rota sintética para síntese da (+)-eldanolida **11**. Exemplo de molécula contendo um padrão (4*S*,5*R*)-4,5-dialquildiidro-2-(3*H*)-furanona: (+)-*trans*-conhaque lactona **12**.

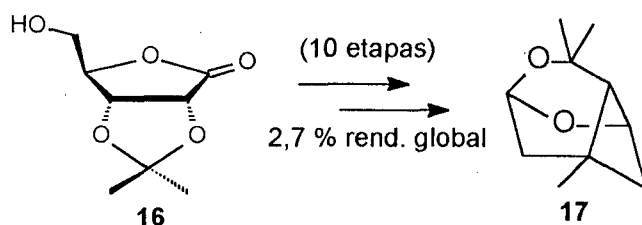
A pirazolina **14** foi utilizada como precursora na síntese da umbelactona **15**, um produto de ocorrência natural. Reação da butenolida **13** com diazometano produziu a pirazolina **14**, que após pirólise forneceu (-)-(S)-umbelactona **15** (Esquema 4).<sup>24</sup>





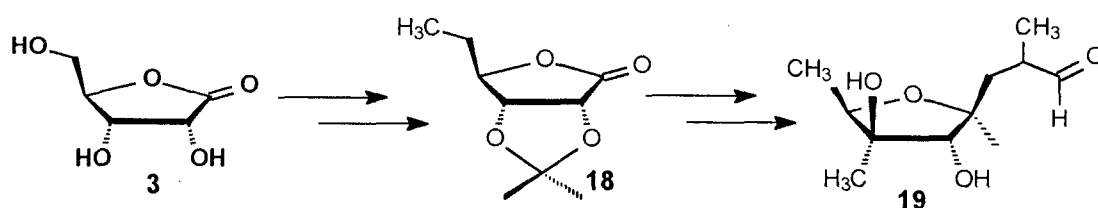
Esquema 4 - Síntese da (-)-(S)-umbelactona 15.

Kandil e Slessor apresentaram a preparação da (+)-lineatina 17, um feromônio de agregação da *Trypodendron Lineatum*, a partir da 2,3-O-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona 16 (Esquema 5).<sup>24</sup>



Esquema 5 - Síntese da (+)-lineatina 17.

A micotoxina (-)-citroviridina e o metabólito fúngico (+)-citroviral 19 foram sintetizadas a partir da D-ribonolactona 3 por Wilcox *et al*,<sup>29</sup> via intermediário 18 (Esquema 6).<sup>24</sup>

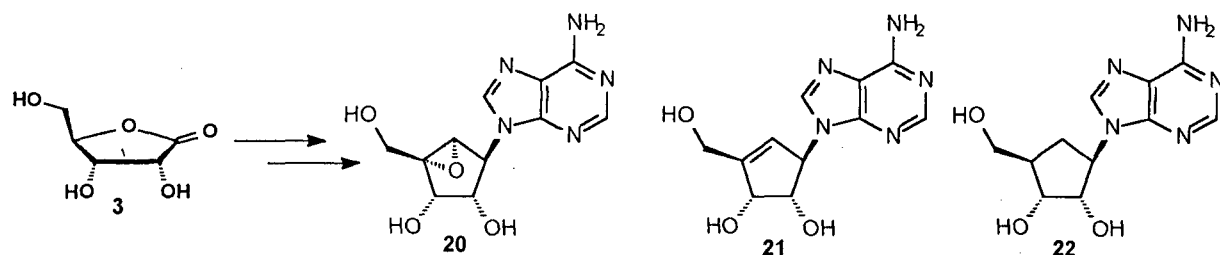


Esquema 6 - Síntese da (+)-citroviral 19.

As propriedades biológicas de nucleosídeos têm sido extensamente estudadas, especialmente como agentes antivirais e antitumorais.<sup>30</sup> Aldonolactonas vêm sendo empregadas como material de partida para a síntese destas classes de compostos. As primeiras rotas sintéticas apresentadas na literatura procedem a partir da redução da aldono-1,4-lactona para a correspondente furanose, que então é acoplada com purinas ou pirimidinas.<sup>24</sup>

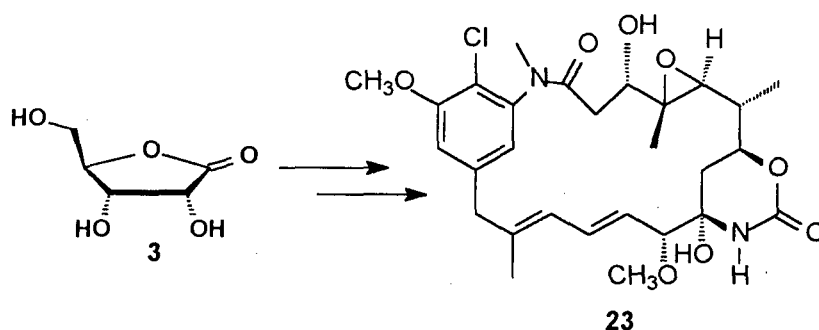
Recentemente, foi apresentada a primeira síntese da (-)-Neplanocina C 20, um nucleosídeo de ocorrência natural (isolado da *Ampullariella regularis*), conhecido

como o menor componente da família das neplanocinas, as quais possuem atividades antibióticas, a partir da D-ribonolactona **3**.<sup>30</sup> Outros carbociclos análogos da adenosina, como a Neplanocina A **21**, e a Aristomicina **22**, foram sintetizados a através do mesmo material de partida (Esquema 7).<sup>24</sup>



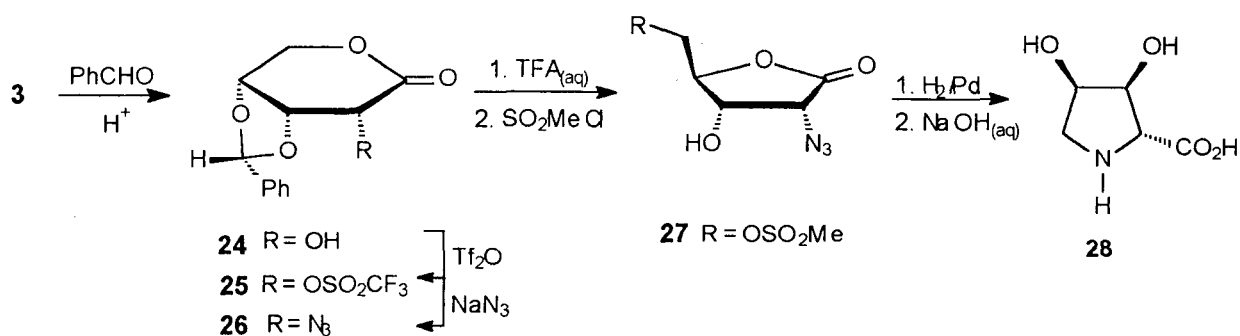
Esquema 7 - Síntese da (-)-Neplanocina C **20**, Neplanocina A **21**, e Aristomicina **22**.

Maitansinóides são interessantes agentes antitumorais de ocorrência natural. Barton *et al*.<sup>31</sup> apresentaram a síntese do bis-nor-4,6-maitansinóide **23** a partir da D-ribono-1,4-lactona **3** (Esquema 8).



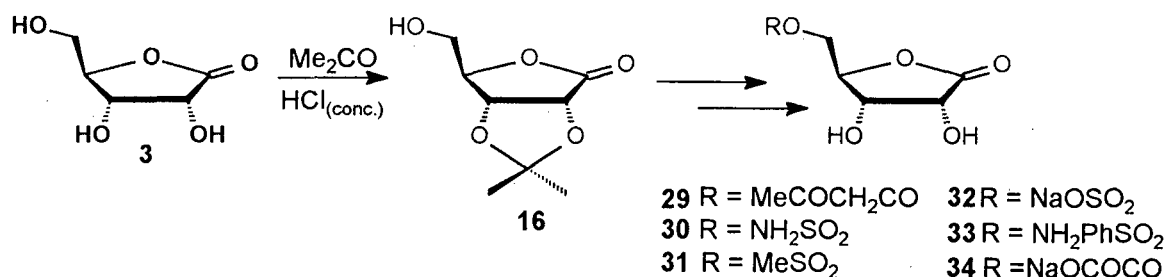
Esquema 8 - Síntese da Maitansinoide **23**.

Uma rota geral para a síntese de amino ácidos polifuncionalizados a partir de aldonolactonas é exemplificado pela síntese do D-amino ácido (2*R*,3*S*,4*R*)-3,4-diidroxiprolina **28** a partir da 3,4-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona **24**, derivado este obtido a partir da reação entre D-ribono-1,4-lactona **3** e benzaldeído, em meio ácido (Esquema 9).<sup>32,33</sup>



**Esquema 9 - Síntese do diidroxiprolina 28 a partir de derivados da D-ribonolactona.**

Bigham *et al* sintetizaram alguns derivados da D-ribono-1,4-lactona **3** como inibidores da arabinose 5-fosfato isomerase, a fim de se obter novas drogas anti-bacterianas ( $\text{IC}_{50} = 8\text{-}36 \text{ mM}$ ); (Esquema 10).<sup>34</sup>



**Esquema 10 - Derivados da D-ribono-1,4-lactona como inibidores da arabinose 5-fosfato isomerase.**

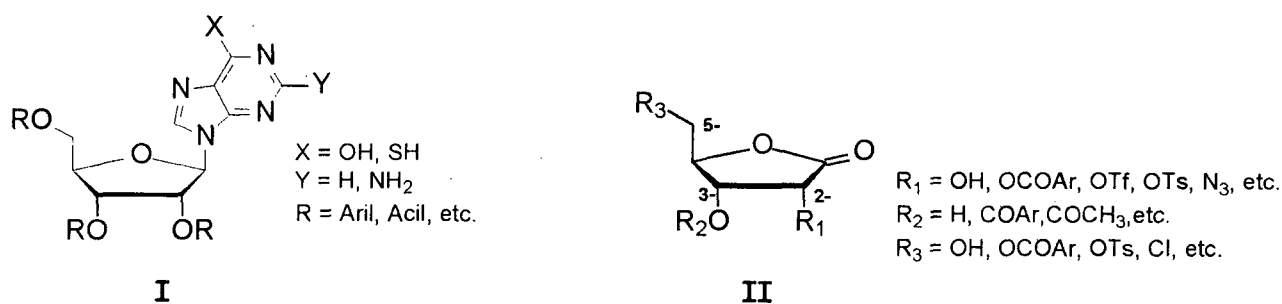
## 1.6 Justificativas

Devido a atividade apenas moderada apresentada pelos nucleosídeos e em virtude das dificuldades experimentais encontradas para a síntese destes compostos (baixa solubilidade em solventes orgânicos e em meio aquoso; difícil separação dos produtos formados; necessidade de protocolos de proteção e desproteção para os grupos de nucleofilicidade semelhantes como OH, NH<sub>2</sub>, SH), surge a necessidade de se buscar modelos alternativos mais simples e que apresentem menores dificuldades sintéticas. Portanto, a utilização de derivados de carboidratos pode ser considerada uma importante alternativa para procurar superar estas adversidades. Desta forma, escolheu-se a D-ribono-1,4-lactona **3** como material de partida para a

preparação de análogos de carboidratos, mantendo-se os centros quirais do anel furanosídeo dos nucleosídeos estudados, para assim avaliar a necessidade de haver bases nitrogenadas nas estruturas das moléculas candidatas a fármaco. E finalmente, em um trabalho futuro, permitir que diferentes bases nitrogenadas sejam acopladas aos derivados seletivamente substituídos,<sup>30,35</sup> onde poderá ser criada uma rota alternativa para síntese seletiva de nucleosídeos.

## 2 OBJETIVOS E METAS

O objetivo central desta Dissertação envolve a síntese de inibidores seletivos da enzima GAPDH de *T. cruzi*. Serão preparados derivados da D-ribono-1,4-lactona **3**, como complemento aos estudos realizados com derivados de nucleosídeos contendo grupamentos aromáticos seletivamente substituídos nas posições 2-, 3- e 5- do anel ribosídico e análogos da inosina contendo um grupo tiol na posição 6'- do anel purínico (**I**, Esquema 11),<sup>17,18</sup> visando a obtenção de substâncias que apresentem maior atividade inibitória e simplificação estrutural (**II**, Esquema 11).<sup>25,28,32-45</sup> Estes estudos objetivam determinar os grupos farmacofóricos importantes no esqueleto nucleosídico.



**Esquema 11 - Síntese de inibidores seletivos da enzima GAPDH de *T. cruzi*.**

Finalmente submeter aos testes de inibição enzimática, todos os candidatos a inibidores sintetizados, apresentados nesta dissertação, a fim de correlacionar a atividade inibitória observada com a estrutura molecular.

Em suma, os objetivos desta Dissertação consistem em:

1. Sintetizar análogos de carboidratos derivados da D-ribono-1,4-lactona;
2. Desenvolver protocolos de proteção e desproteção para síntese de análogos seletivamente substituídos de carboidratos derivados da D-ribono-1,4-lactona, a fim de buscar uma simplificação estrutural;
3. Avaliar aspectos estruturais de anéis de 5 e 6 membros para derivados da D-ribono-1,4-lactona por difração de Raio-X e RMN;
4. Submeter os compostos sintetizados aos testes de inibição enzimática frente à TcGAPDH.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Síntese dos derivados peracilados

Os compostos **35-39** foram sintetizados em uma etapa, a partir da reação entre a D-ribonolactona **3**, e 4,5 equivalentes do respectivo cloreto de ácido, em meio básico, com 82-95 % de rendimento (Tabela 1).

Em todas as reações, foram tomados os devidos cuidados para evitar-se a presença de água no meio reacional. Para tanto, utilizou-se condição de solventes anidros (piridina), e tubos secantes de cloreto de cálcio.

Praticamente todas as acilações foram realizadas mantendo-se a solução reacional sob agitação por cerca de 24 h, uma vez que se procurou seguir procedimentos já descritos na literatura.<sup>42</sup> Porém, como será exposto a seguir, estas reações são muito rápidas e podem ser realizadas em tempos reacionais menores.

Todos os derivados foram obtidos como produtos cristalinos em excelentes rendimentos (Tabela 1), além dos compostos **36-39** serem inéditos. Os compostos **37** e **38** tiveram suas análises elementares de CHN determinadas.

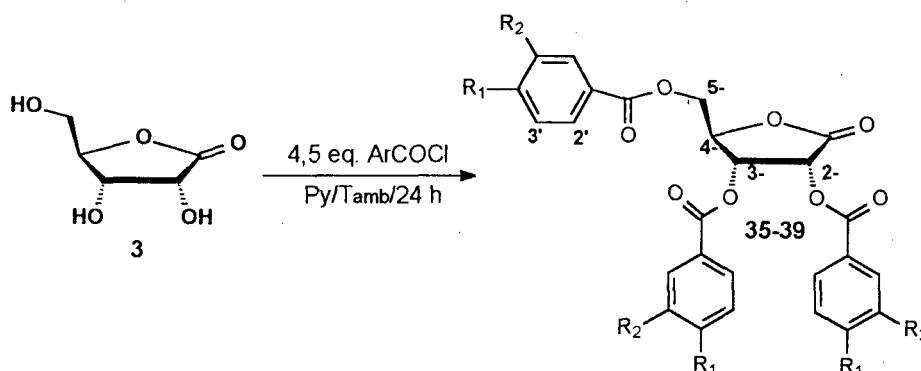
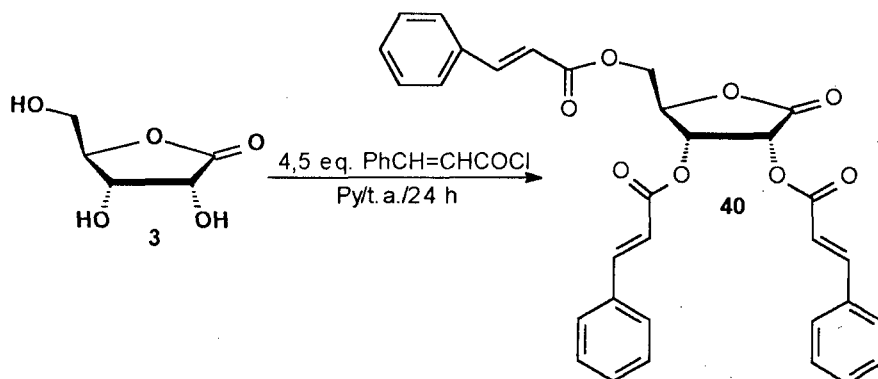


Tabela 1- Derivados peracilados **35-39** e seus respectivos substituintes  $R_1$  e  $R_2$ .

Composto	$R_1$	$R_2$	Rend. (%) [lit.]
<b>35</b> S9	H	H	90 [91] <sup>42</sup>
<b>36</b> S123 1Fr	NO <sub>2</sub>	H	95
<b>37</b> S133-2	Cl	H	90
<b>38</b>	MeO	H	92
<b>39</b>	Cl	NO <sub>2</sub>	82

A mesma metodologia foi empregada para a síntese do derivado peracilado **40** a fim de obter-se um composto contendo um espaçador entre o grupamento fenil e a carbonila, para então avaliar quão próximo o núcleo aromático deve estar do grupo C=O para aumentar a inibição enzimática (Esquema 12).



Esquema 12 - Síntese do derivado tri-cinamoil-D-ribonolactona **40**.

Porém, o composto **40** foi obtido em somente 30% de rendimento, estando sempre contaminado pela presença de ácido cinâmico, mesmo após sucessivas lavagens com NaHCO<sub>3</sub> 5% e recristalizações, e portanto, sua síntese foi descartada.

Cabe ressaltar que devido a seu baixo ponto de fusão (P. f. = 45-46 °C) e alto P.E., o cloreto de cinamoila foi utilizado sem qualquer purificação, devido a dificuldade encontrada para sua recristalização ou destilação. Assim, este pode ser o motivo pela qual obteve-se o baixo rendimento reacional.

### 3.1.1 Análises espectroscópicas dos derivados peracilados

O espectro de Infra Vermelho (IV), para o composto 2,3,5-tri-O-(4'-cloro-benzoil)-D-ribono-1,4-lactona **37**, realizado em pastilha de KBr, apresenta bandas em 1788 e 1726 cm<sup>-1</sup>, características de estiramento C=O de lactona e de éster conjugado com um sistema aromático, respectivamente. O desaparecimento da banda larga de OH na região compreendida entre 3300-3500 cm<sup>-1</sup>, presente no espectro da lactona de partida, é mais um forte indício da formação do produto esperado.

Todos os derivados deste grupo exibem a banda referente a carbonila do éster em intensidade pronunciadamente maior do que a de carbonila da lactona, fato este atribuído a presença de três carbonilas de éster e somente uma carbonila de lactona.

O espectro de RMN- $^1\text{H}$ , em  $\text{CDCl}_3$ , para o composto 2,3,5-tri-O-(4'-cloro-benzoil)-D-ribono-1,4-lactona **37**, mostra dois conjuntos de picos: um relativo aos hidrogênios do anel da lactona, entre 4,6 e 6,3 ppm, e outro referente aos hidrogênios aromáticos, compreendidos entre 7,3 e 8,1 ppm (Figura 5).

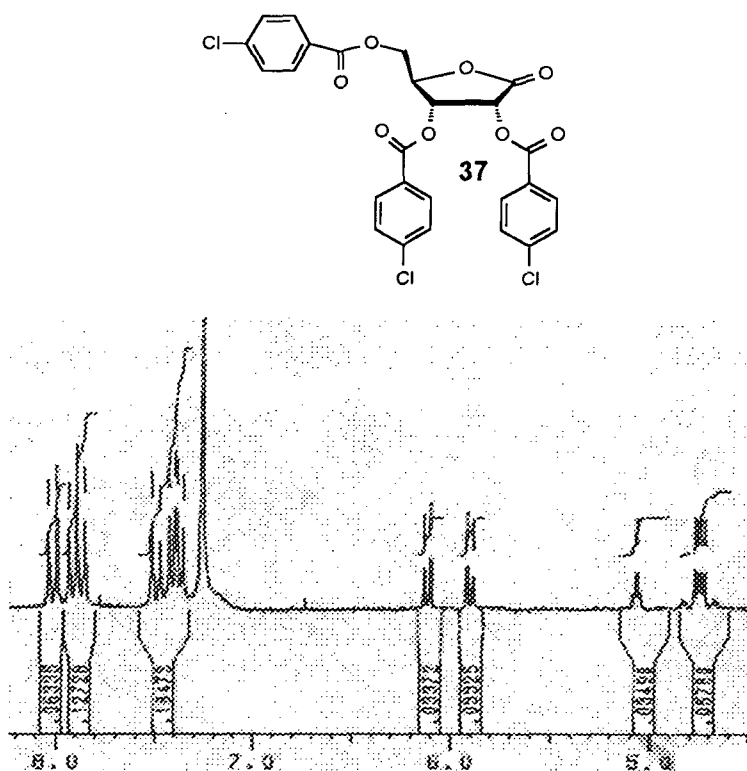


Figura 5 - Espectro de RMN- $^1\text{H}$  para o composto 2,3,5-tri-O-(4'-cloro-benzoil)-D-ribono-1,4-lactona **37**.

O multipeto em 4,60-4,85 ppm é atribuído aos hidrogênios diastereotópicos do grupo  $\text{CH}_2$ , que acoplam entre si e com H-4. Como esperado, seu deslocamento está a campo mais alto do conjunto. O multipeto centrado em 5,07 ppm corresponde ao H-4. O sinal observado é decorrente do acoplamento deste com os hidrogênios do grupo  $\text{CH}_2$ . O dubleto em 5,92 ppm é atribuído a H-3, que por sua vez acopla com H-2 observando-se um  $^3J = 6,4$  Hz. Finalmente, tem-se H-2 como um dubleto em 6,13 ppm ( $^3J = 6,4$  Hz). Em virtude deste hidrogênio estar ligado a um carbono  $\alpha$



à carbonila da lactona e ainda a um benzoato, torna-se o mais desblindado do conjunto. As integrações dos hidrogênios do anel da lactona estão numa relação de 2:1:1:1, corroborando com as atribuições acima descritas.

Entre 7,3-7,6 ppm encontram-se os hidrogênios aromáticos 2' (6 hidrogênios), enquanto que de 7,8 a 8,1 ppm apresentam-se os hidrogênios 3' (6 hidrogênios). As integrações relativas aos hidrogênios aromáticos (2' e 3'), são provas da formação do produto triacilado.

Os demais espectros para este grupo de compostos apresentam padrões muito semelhantes, observado-se pequenas modificações nos deslocamentos químicos decorrentes da presença de grupos doadores ou retiradores no grupamento acil (Tabela 2).

**Tabela 2 – Deslocamento Químico  $\delta$  (ppm) para os hidrogênios dos compostos peracilados 35-40.**

Composto	$\delta$ H-2 [multiplicidade; J(Hz)]	$\delta$ H-3 [multiplicidade; J(Hz)]	$\delta$ H-4 [multiplicidade]	$\delta$ CH <sub>2</sub> [multiplicidade]
<b>35</b>	6,18 [d;6,4]	5,94 [d;6,4]	5,09 [m]	4,65–4,90 [m]
<b>36</b>	6,43 [d;6,2]	6,08 [d;6,2]	5,45 [m]	4,86 [m]
<b>37</b>	6,13 [d;6,2]	5,92 [d;6,2]	5,07 [m]	4,60–4,85 [m]
<b>38</b>	6,15 [d;6,3]	5,90 [d;6,3]	5,07 [m]	4,70–4,95 [m]
<b>39</b>	6,13 [d;6,3]	5,88 [d;6,3]	5,04 [m]	4,60–4,85 [m]
<b>40</b>	6,02	5,77	4,94	4,60

$\delta$  (ppm); J (Hz); d=dublete, m=multiplete.

Ao analisar os valores de  $\delta$  presentes na Tabela 2, percebe-se que o derivado tri-4'-nitrobenzoil **36** apresenta os hidrogênios do anel da lactona e do grupo CH<sub>2</sub>, cerca de 0,2-0,3 ppm mais desblindados do que o composto tri-benzoil **35**, indicando um pronunciado efeito retirador causado pelo grupo NO<sub>2</sub>. Já os demais derivados **37-39** forneceram resultados muito parecidos com os do composto **35**, demonstrando que seus substituintes pouco influenciaram nos deslocamentos químicos observados.

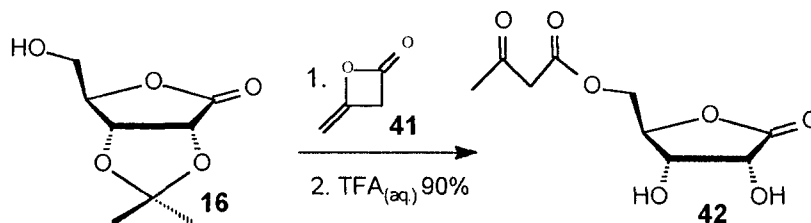
### 3.2 Síntese de derivados da D-ribonolactona seletivamente substituídos

Ao trabalhar-se com derivados de carboidratos, é frequente a necessidade de promover transformações regio- e estereoespecíficas sobre os vários grupos hidroxila presentes nesses substratos. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos de proteção e desproteção para cada um desses grupamentos.

Apesar do grande número de trabalhos descritos na literatura que utilizam a D-ribono-1,4-lactona **3** como material de partida para a síntese de produtos naturais, aminoácidos, auxiliares quirais,<sup>23,24,30-32,46</sup> ainda não existem metodologias sintéticas para a preparação de seus derivados acilados mono substituídos nas posições 2-, 3- e 5-. Desta forma, procurou-se desenvolver procedimentos que fossem simples e baratos, para obter compostos que após testados pudessem indicar quanto cada grupo acil contribui para o aumento da atividade biológica.

#### 3.2.1 Síntese dos derivados da D-ribolactona seletivamente substituídos na posição 5-

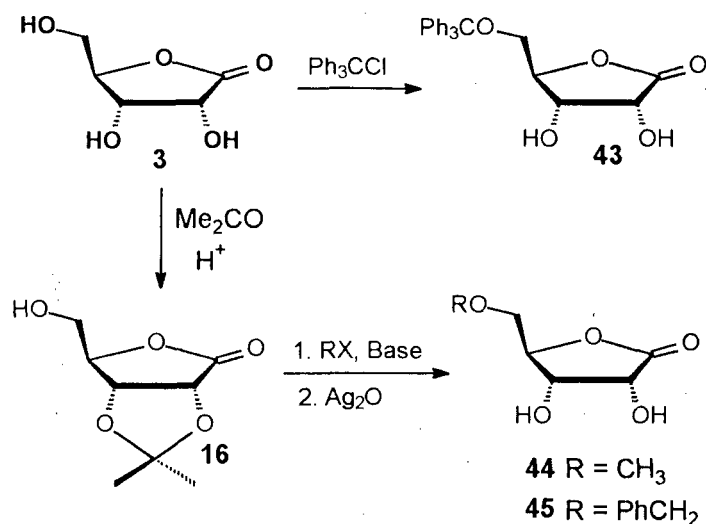
A literatura apresenta somente a preparação de um único éster sintetizado seletivamente na posição 5- da  $\gamma$ -D-ribonolactona **3**. Bigham *et al*<sup>34</sup> reportaram uma metodologia geral para síntese de derivados 5-sulfonil-D-ribonolactona, e ainda a preparação do derivado 5-acetoacetil-D-ribonolactona **42**, através da reação de **16** com diceteno **41**, e subsequente hidrólise ácida do grupo isopropilideno, com TFA aquoso 90 %. Porém, cabe salientar que não foi desenvolvida uma metodologia para síntese de ésteres (Esquema 13).



Esquema 13 - Ester sintetizado seletivamente na posição 5-.

Como foi descrito na seção 1.6.1, Font *et al*<sup>28</sup> prepararam uma série de 5-alkyl derivados da D-ribonolactona **3** visando a obtenção de butenolidas, a partir de

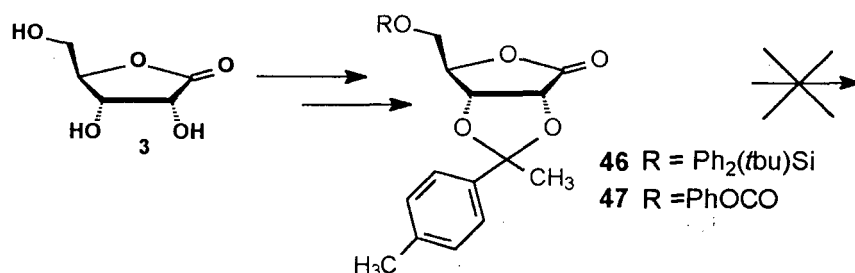
uma rota sintética semelhante a metodologia proposta para a síntese de ésteres seletivamente substituídos na posição 5- da lactona **3** (Esquema 14).



**Esquema 14 - Síntese de derivados alquil substituídos na posição 5- da D-ribonolactona **3**.**

Cabe ressaltar que o composto 5-O-tritil-D-ribonolactona **43** foi preparado em uma única etapa utilizando a D-ribonolactona **3** como material de partida, através do controle estequiométrico da reação.<sup>28</sup>

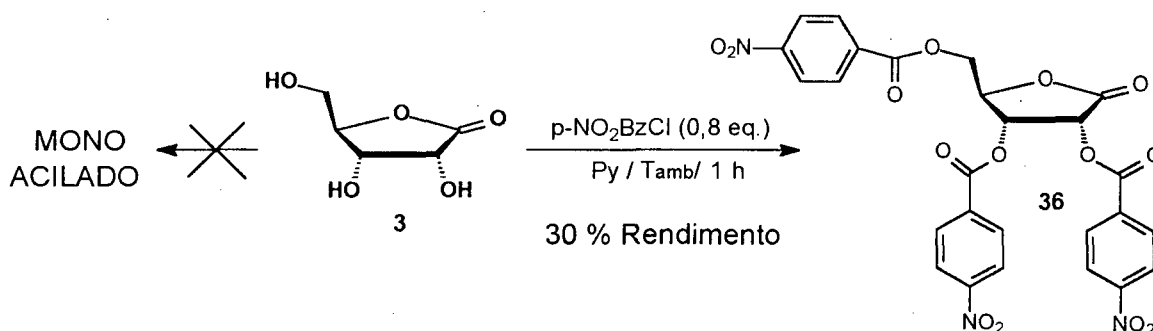
Em uma tentativa para desenvolver uma metodologia de proteção e desproteção de 1,2- e 1,3-dióis, em condições brandas, a partir de reagentes baratos, Lipshutz *et al*<sup>47</sup> utilizaram o dimetil acetal derivado da *p*-metoxiacetofenona ou  $\alpha$ ,*p*-dimetoxiestireno, como grupo protetor, para um conjunto representativo de carboidratos. Porém, a desproteção com  $\text{SnCl}_4$  do acetal derivado da  $\gamma$ -D-ribonolactona **3**, substituídos com carbonato de fenila, ou *tert*-butildifenilsilil éter, não foi realizada com sucesso (Esquema 15).



**Esquema 15 - Tentativa de síntese seletiva da posição 5- da D-ribonolactona **3**.**

### 3.2.1.1 Preparação de compostos 5-acilados via controle estequiométrico

É bem sabido que álcoois primários são mais reativos que secundários, porém a tentativa de obter-se o derivado mono acilado, em uma única etapa, foi totalmente infrutífera. Após uma hora, a reação entre o composto **3** e 0,8 equivalentes de cloreto de 4'-nitrobenzoil forneceu único produto, que foi caracterizado como tri-4'-nitrobenzoil-D-ribonolactona **36** (Esquema 16). Esse cloreto de ácido foi escolhido devido à facilidade de manipulação, uma vez que é sólido a temperatura ambiente e facilmente purificado por recristalização.

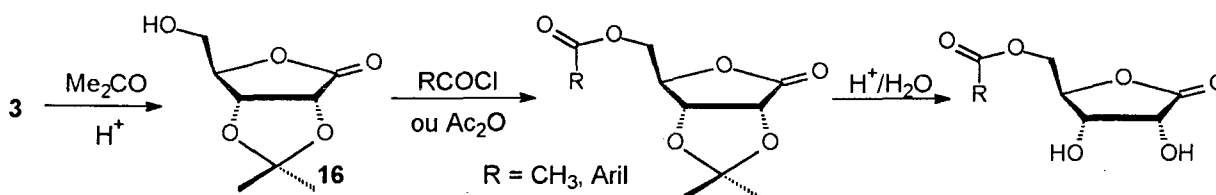


Esquema 16 – Tentativa de acilação direta da posição 5.

Além da utilização de uma quantidade pequena do cloreto de ácido, tentou-se promover a acilação seletiva com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/AcOEt, porém sem sucesso.<sup>48,49</sup>

### 3.2.1.2 Preparação de compostos 5-acilados em três etapas

Devido aos insucessos das metodologias empregadas para preparação de derivados mono acilados na posição 5- da D-ribonolactona **3** em uma etapa, foi necessário desenvolver uma rota sintética alternativa. Essa rota foi baseada na proteção dos grupos dióis vicinais com acetona em meio ácido, seguido de acilação da posição 5- com cloretos de ácido (ou anidrido acético) em piridina, e subsequente hidrólise ácida do grupo protetor (Esquema 17).



Esquema 17 - Rota sintética para preparação dos derivados mono acilados na posição 5-.

### 3.2.1.2.1 Preparação da isopropilideno lactona 16

O derivado isopropilideno **16** foi descrito pela primeira vez por Hough e Mitchell<sup>43</sup> na década de 50, a partir da reação entre D-ribonolactona **3**, acetona e HCl concentrado, mantidos sob agitação a temperatura ambiente, durante 18 h. Desde então, foram reportados inúmeras modificações experimentais para a sua síntese, envolvendo principalmente o tratamento reacional.<sup>28,34,40,43,45,50-52</sup>

Ao realizar a reação em pequena escala (100-200 mg), procurou-se seguir o procedimento descrito por Hough e Mitchell,<sup>43</sup> com uma pequena modificação no tratamento reacional, devido a indisponibilidade e inconveniência de se utilizar carbonato de chumbo ou prata, como agentes de neutralização do meio. Desta forma, esses sais foram trocados por carbonato de potássio, obtendo-se o produto com o mesmo rendimento descrito na literatura (73%).<sup>43</sup>

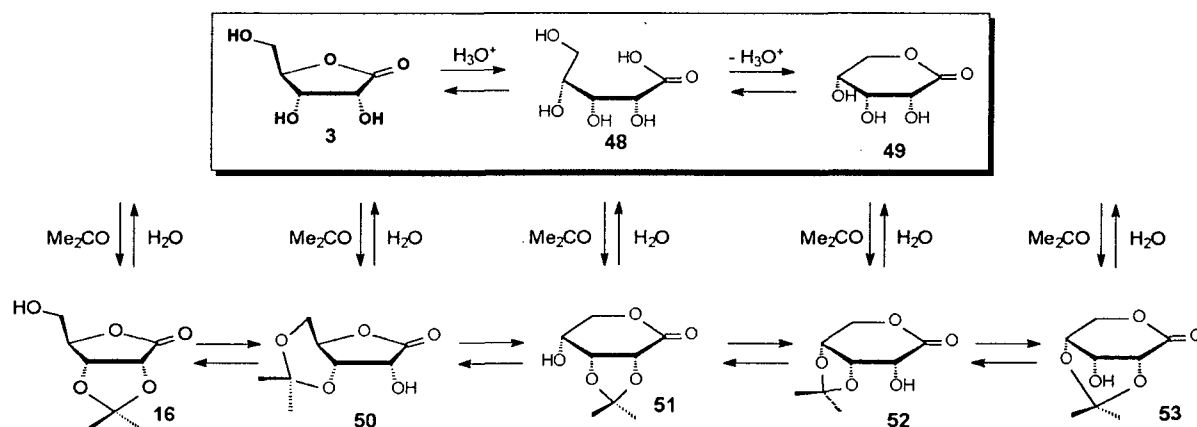
Porém, ao repetir-se a reação em uma escala maior (2 gramas), o tratamento realizado com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mostrou-se pouco prático devido à dificuldade de remoção por filtração, e pelo fato do composto **16** ser parcialmente solúvel em meio aquoso. Consequentemente, o composto desejado foi obtido como um produto oleoso, estando sempre contaminado com o sal, mesmo após inúmeras tentativas de recristalização.

Assim, testou-se outras metodologias descritas na literatura, como a apresentada por Pedersen *et al*,<sup>51</sup> o qual substitui HCl por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, além de manter a solução formada com acetona e a lactona **3**, sob refluxo durante 1,5 h. No entanto, foi novamente obtido um produto oleoso em apenas 23% de rendimento, muito aquém dos 99% publicados.

Finalmente, utilizou-se o tratamento reacional descrito por Rodriguez.<sup>40</sup> Diluição dos óleos em diclorometano seguido de tratamento com NaHCO<sub>3</sub> saturado, forneceu o 2,3-isopropilideno-D-ribonolactona **16** com 73% de rendimento (P. f. = 134-135 °C, P. f.<sup>43</sup> = 138-139 °C), estando os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e IV de acordo com os reportados na literatura.<sup>40,50,52</sup>

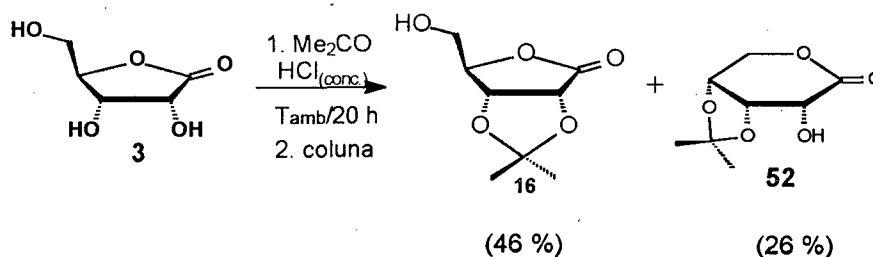
As formações de acetais cíclicos derivados de aldonolactonas são extremamente dependentes das condições experimentais utilizadas. Frequentemente, são observadas interconversões entre 1,4- e 1,5-lactonas, o que em muitos casos leva a erros de atribuições estruturais.<sup>24,25,41,44</sup> Consequentemente,

nem sempre é possível prever qual estrutura irá prevalecer em decorrência dos vários equilíbrios existentes. Portanto, a reação de **3** e acetona catalisada por  $H^+$ , teoricamente, pode levar a 5 estruturas em condições de equilíbrio. Estes produtos são formados a partir da isomerização da 1,4-lactona **3** para 1,5-lactona **49**, através do intermediário **48**, ou via isomerização dos derivados acetal após a isopropilidenação.<sup>52</sup> O equilíbrio é deslocado para o lado dos acetais utilizando condições que evitem a presença de água; já em meio aquoso, o equilíbrio é deslocado para as lactonas desprotegidas (Esquema 18).



**Esquema 18 - Possíveis estruturas em condições de equilíbrio para a migração do grupo acetal da lactona de 5 e 6 membros.**

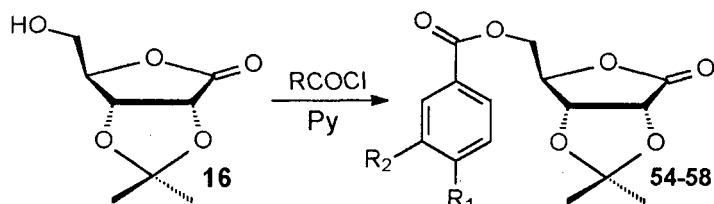
De fato, Joullié *et al.*,<sup>52,53</sup> através de estudos de RMN- $^1H$  e RMN- $^{13}C$ , reportaram que os produtos **16** e **52** são formados em 46% e 26% de rendimento, respectivamente. Esses compostos tiveram suas estruturas elucidadas por difração de Raio-X,<sup>53</sup> a partir da síntese de derivados, para confirmar tais atribuições (Esquema 19).



**Esquema 19 - Estruturas determinadas por difração de Raio-X para o grupo acetal da lactona de 5 e 6 membros.**

### 3.2.1.2.2 Síntese os derivados 5-acil-2,3-isopropilideno-D-ribonolactona

O derivado isopropilideno **16** foi utilizado como material de partida para a síntese de uma série de compostos 5-acilados. Reação entre a lactona **16** e o respectivo cloreto de acila, em piridina, formou os derivados **54-58**, obtidos como produtos cristalinos, em excelentes rendimentos (80-99%). Cabe ressaltar que os compostos **54-58** são inéditos e ainda, que as lactonas **54** e **55** também foram caracterizados por CHN (Esquema 20).

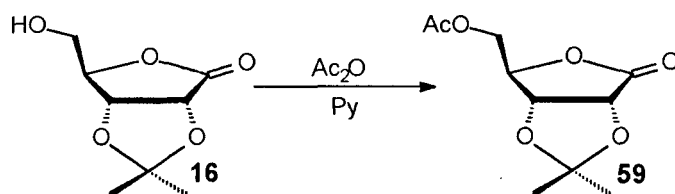


Esquema 20 - Síntese dos derivados 5-acil-2,3-isopropilideno.

Tabela 3 - Derivados 5-O-acil-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **54-58**, seus respectivos substituintes  $R_1$  e  $R_2$ , e rendimentos reacionais.

Composto	$R_1$	$R_2$	Rend. (%)
<b>54</b>	H	H	99
<b>55</b>	$\text{NO}_2$	H	90
<b>56</b>	Cl	H	92
<b>57</b>	MeO	H	99
<b>58</b>	Cl	$\text{NO}_2$	80

Com a intenção de avaliar a necessidade da presença de um grupo aril próximo da carbonila dos compostos 5-acilados, acetilou-se o composto **16** utilizando uma solução de anidrido acético e piridina, resultando na lactona acetilada **59**, com 88% de rendimento (Esquema 21).<sup>45</sup>



Esquema 21 - Acetilação do derivado 2,3-isopropilideno D-ribonolactona **16**.

O IV do composto 2,3-isopropilideno-5-O-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **55**, realizado em pastilha de KBr, apresenta duas bandas de intensidade forte em 1782 e 1740  $\text{cm}^{-1}$ , características de estiramento C=O de lactona e de éster, respectivamente, e dois estiramentos de  $\text{NO}_2$  em 1532 e 1354  $\text{cm}^{-1}$ . A inexistência da banda larga de OH entre 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$  aponta a formação do grupo acil. Também foi observado que a intensidade das bandas referentes às carbonilas para os derivados 5-acil-2,3-isopropilideno-D-ribonolactona **54-58** são muito semelhantes, uma vez que se tem uma proporção igual de C=O de éster e lactona.

O espectro de RMN- $^1\text{H}$  do derivado **55** em  $\text{CDCl}_3$  como solvente, demonstra três conjuntos de sinais: a campo mais alto, os hidrogênios das metilas, em seguida os hidrogênios do anel da lactona, e a campo baixo, os hidrogênios aromáticos (Figura 6).

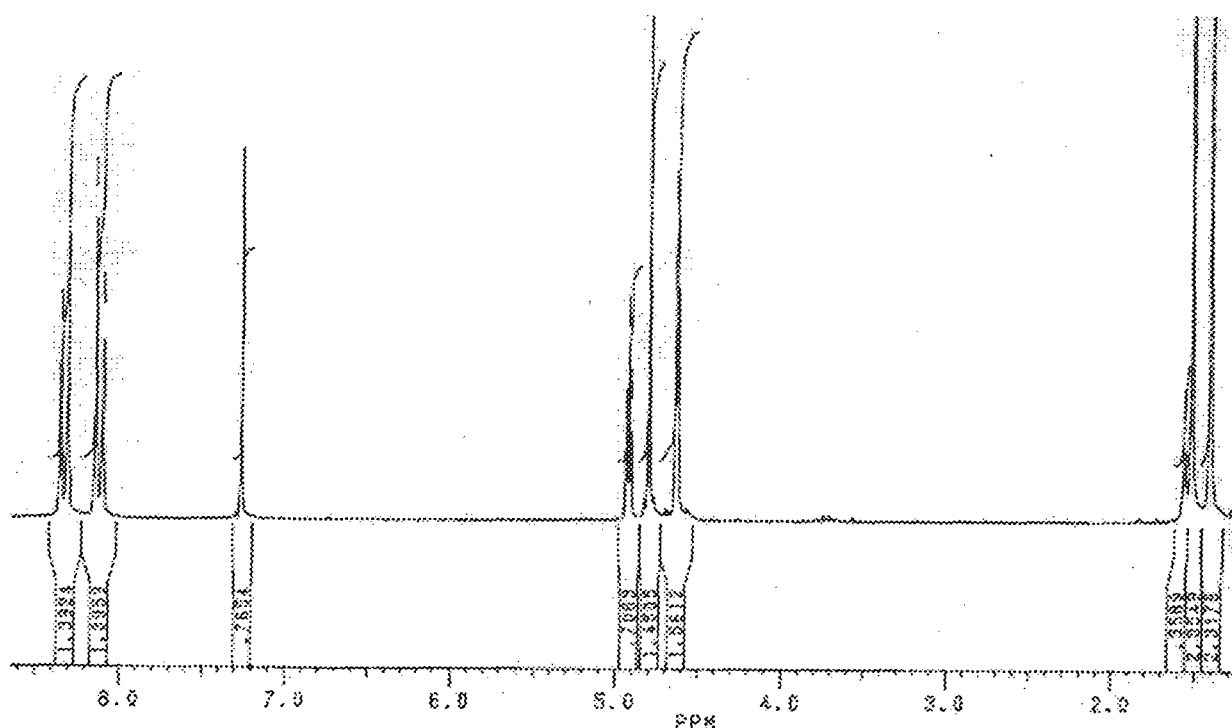


Figura 6 - Espectro de RMN- $^1\text{H}$  para o composto 2,3-isopropilideno-5-O-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **55**.

Assim, o espectro de RMN- $^1\text{H}$  para a referida lactona apresenta os seguintes sinais: dois singletos em 1,40 e 1,51 ppm (3 hidrogênios cada), atribuídos aos hidrogênios das metilas do isopropilideno, um multipeto em 4,63 ppm (2 hidrogênios) correspondente aos hidrogênios metilênicos, um multipeto em 4,79 ppm (2 hidrogênios) relativo a H-2 e H-3, um multipeto em 4,93 ppm apontado



como H-4, e finalmente, dois dubletos em 8,12 e 8,32 ppm (hidrogênios 2' e 3'; J = 8,8 Hz; 2 hidrogênios cada) em consequência da presença do grupo NO<sub>2</sub> na posição para do anel aromático.

Os demais compostos deste conjunto possuem um padrão de sinais muito semelhante aos discutidos acima (Tabela 4). A principal modificação observada é a formação de um duplo dubleto ou multipeto, ao invés de somente um dubleto, para os hidrogênios do CH<sub>2</sub>.

**Tabela 4 - Deslocamento Químico  $\delta$  (ppm) para os hidrogênios dos compostos 16, 54-58 hidrogênios do anel da lactona em CDCl<sub>3</sub>.**

Composto	$\delta$ H-2 (multiplicidade)	$\delta$ H-3 (multiplicidade)	$\delta$ H-4 (multiplicidade)	$\delta$ CH <sub>2</sub> (multiplicidade)	
<b>16</b>	4,90–4,75 (m)		4,63 (s)	3,98 (d)	3,80 (d)
<b>54</b>	4,79 (m)		4,92 (t)	4,63 (dd)	4,48 (dd)
<b>55</b>	4,79 (m)		4,92 (m)	4,63 (m)	
<b>56</b>	4,78 (m)		4,92 (t)	4,66(dd)	4,52 (dd)
<b>57</b>	4,78 (m)		4,92 (t)	4,68 (dd)	4,42 (dd)
<b>58</b>	4,78 (m)		4,91 (m)	4,63 (m)	

$\delta$  (ppm); d=dubleto, dd=duplo dubleto, m=multipeto, s=singeto, t=tripeto.

Ao analisar os dados contidos na Tabela 4, percebe-se que as acilações deslocaram os hidrogênios metilênicos em torno de 0,6 ppm para campo baixo, devido ao efeito causado pelo grupo retirador na posição  $\alpha$ . Esse efeito também é notado, porém com menor intensidade em virtude do maior distanciamento dos grupos acil, nos deslocamentos dos hidrogênios H-4 (0,3 ppm). Já os hidrogênios H-2 e H-3 de **54-58**, por estarem muito longe do substituinte acil, não sofreram modificações.

Caso os derivados **16, 54-58** fossem 1,5-lactonas, com o grupo isopropilideno ligado nas posições 3-,4- (estrutura **52**), esperar-se-ia encontrar padrões de deslocamentos químicos exatamente inversos aos observados, ou seja, CH<sub>2</sub> não sofreria modificações, enquanto que H-2 desblindaria. Estes fatos corroboram com as atribuições estruturais para os derivados **16, 54-58**. Portanto, esses compostos são 1,4-lactonas com o grupo isopropilideno ligados às posições 2- e 3-.

### 3.2.1.2.3 Hidrólise do grupo isopropilideno

Finalmente, a terceira etapa desta metodologia para a preparação de derivados da D-ribonolactona **3** seletivamente acilados na posição 5-, ou seja, hidrólise do grupo isopropilideno, foi realizada de duas maneiras. Numa delas, utilizou-se ácido acético 10% em condições drásticas, 3 h sob refluxo. Porém, com exceção da lactona **64**, obtida em 80% de rendimento, os rendimentos foram apenas moderados (45-65%). Na outra, empregou-se ácido trifluoroacético (TFA) 50%, em condições mais brandas, 1,5 h a 35 °C, apresentado excelente rendimento (90-99%), portanto, mais adequada.

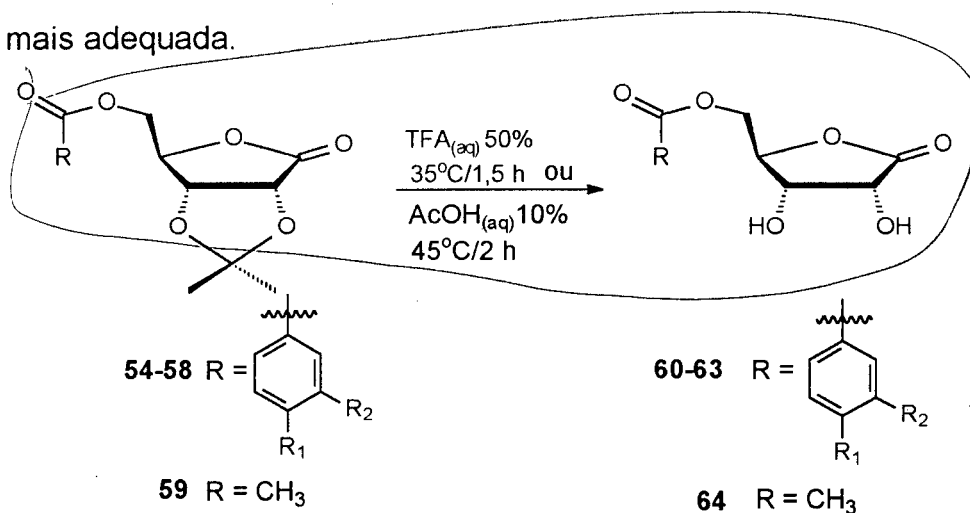


Tabela 5 - Derivados 5-O-acil-D-ribono-1,4-lactona 60-64 e seus respectivos substituintes R<sub>1</sub> e rendimentos reacionais.

Composto	Rend. (%)	
<b>60</b>	TFA (95)	AcOH (50)
<b>61</b>	AcOH (40)	
<b>62</b>	TFA (90)	AcOH (50)
<b>63</b>	TFA (95)	
<b>64</b>	AcOH (80)	

O espectro de IV para o composto 5-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **60**, realizado em pastilha de KBr, apresenta duas bandas alargadas de intensidades moderadas em 3482 e 3276 cm<sup>-1</sup>, atribuídas aos dois grupos OH; duas bandas de intensidade forte em 1770 e 1716 cm<sup>-1</sup>, características de estiramento C=O de lactona e de éster, respectivamente. Novamente, como fora comentado para os derivados protegidos **54-58**, as intensidades para as C=O de cada composto deste conjunto são semelhantes, indicando uma proporção de 1:1 para as carbonilas.

O espectro de RMN- $^1\text{H}$  para a lactona **60**, em DMSO, apresenta os seguintes sinais: um multipeto centrado em 4,26 ppm atribuído ao H-4, um multipeto entre 4,40–4,54 ppm referente aos hidrogênios do grupo metileno e H-3 (3 hidrogênios); um multipeto centrado em 4,59 ppm correspondente ao H-2 (1 hidrogênio); dois multipetos em 5,62 e 5,93 ppm respectivo as duas hidroxilas (ver abaixo); e finalmente, um tripleto em 7,55 ppm, um dubleto em 7,67 ppm e um tripleto em 7,95 ppm, referentes aos hidrogênios meta, para e orto do anel aromático, respectivamente (Figura 7).

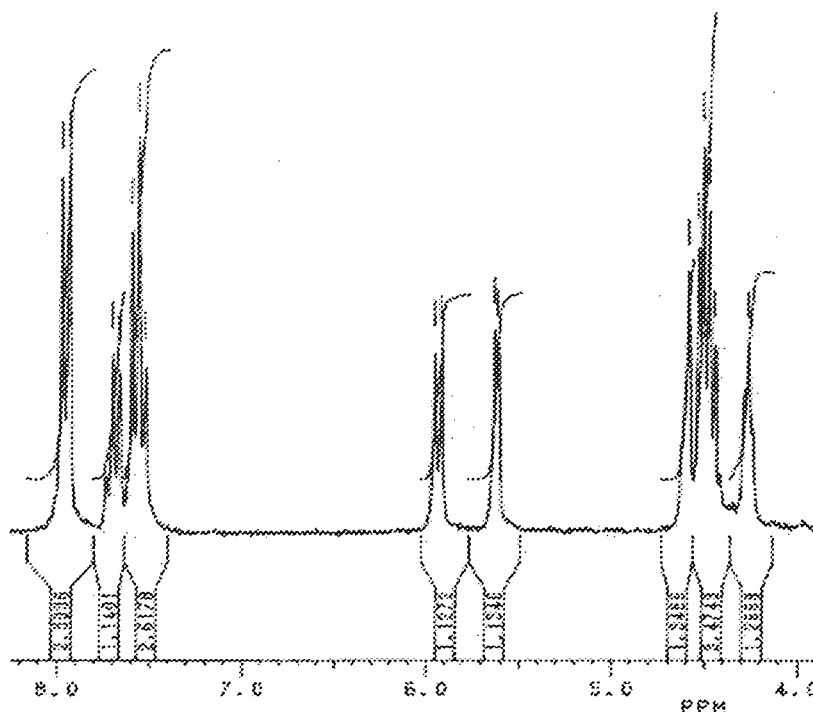


Figura 7- Espectro de RMN- $^1\text{H}$  para o composto 5-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **60** em DMSO- $\text{d}_6$ .

Foram acrescentadas gotas de  $\text{D}_2\text{O}$  ao tudo de RMN contendo uma solução do respectivo composto para identificar os hidrogênios das hidroxilas (Figura 8). Ao comparar os espectros das Figuras 7 e 8 para o composto 5-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **60**, percebe-se que após a adição de  $\text{D}_2\text{O}$  ocorreu o desaparecimento dos sinais em 5,62 e 5,93 ppm, estes portanto são atribuídos aos hidrogênios das hidroxilas, os quais em consequência da sua labilidade, trocam seus hidrogênios por deutério.

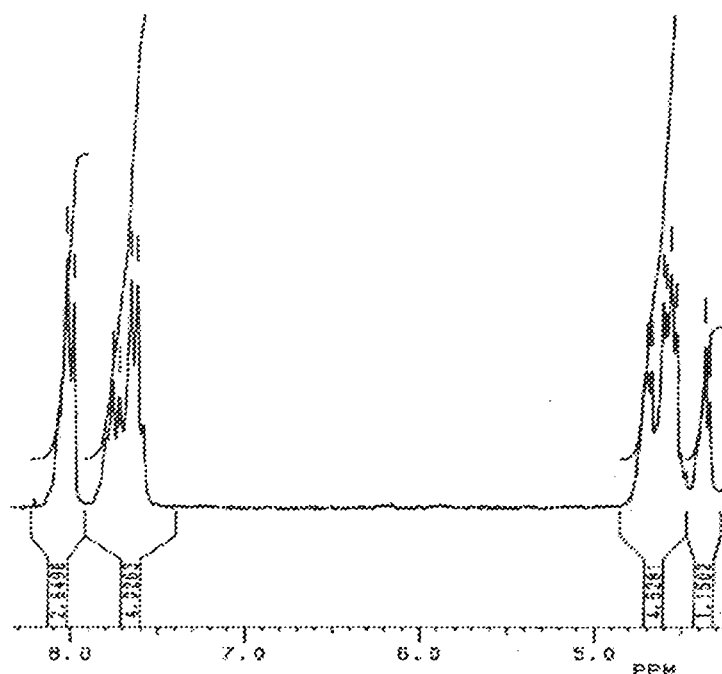


Figura 8 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H em DMSO e D<sub>2</sub>O para o composto 5-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **60**.

Os demais compostos deste conjunto possuem um padrão de sinais muito semelhantes aos discutidos acima (Tabela 6).

Tabela 6 - Descolamento Químico  $\delta$  (ppm) para os hidrogênios do anel da lactona em DMSO, para os compostos **60-64**.

Composto	$\delta$ H-2 e H-3 (multiplicidade)	$\delta$ H-4 (multiplicidade)	$\delta$ CH <sub>2</sub> (multiplicidade)
<b>60</b>	4,53 (m)	4,35 (m)	4,46 (m)
<b>61</b>	4,40-4,60 (m)	4,25 (m)	4,40-4,60 (m)
<b>62</b>	4,58 (m)	4,27 (m)	4,47 (m)
<b>63</b>	4,57 (m)	4,26 (m)	4,40-4,65 (m)
<b>64</b>	4,10-4,55 (m)		

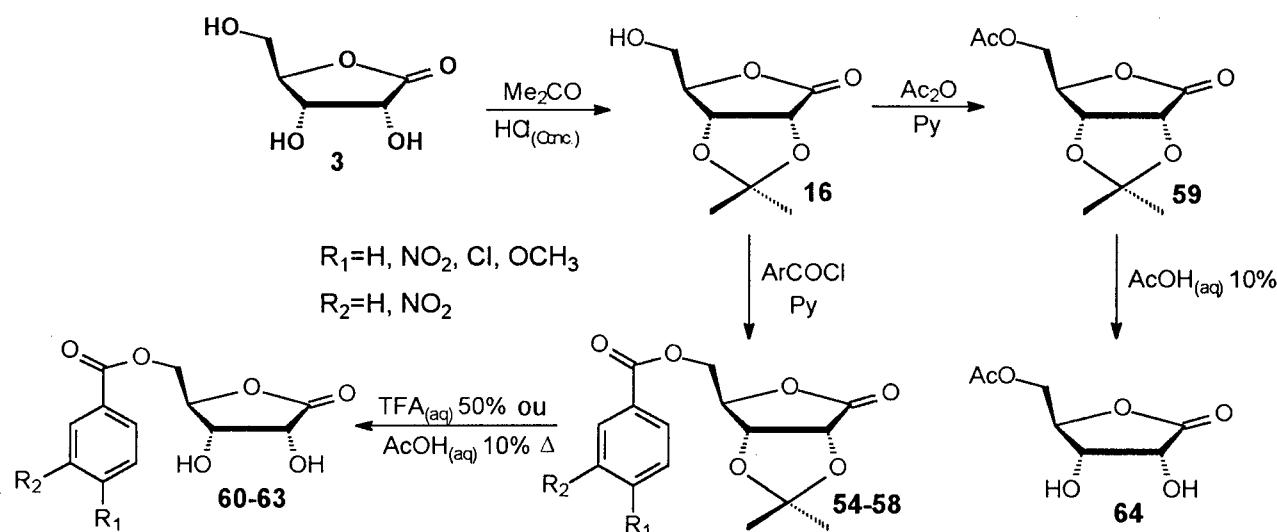
$\delta$  (ppm); m=multipleteo.

Deve-se ressaltar que todos os sinais para os hidrogênios referentes ao anel da lactona estão sobrepostos. Este fato está de acordo com o esperado para 1,4-lactonas, uma vez que os hidrogênios do grupo metileno encontram-se desblindados, devido à presença do grupo 5- acil em  $\alpha$ . Se a acilação tivesse ocorrido na posição 2-, via intermediário **52** (Esquema 18), o espectro de RMN-<sup>1</sup>H revelaria picos bastante distintos para os hidrogênios em discussão, como será observado para os compostos **67,87-89** (seção 3.3.1).

Portanto, desenvolveu-se uma nova metodologia para síntese ésteres derivados da D-ribonolactona **3**, seletivamente substituídos na posição 5-, utilizando

condições brandas, reagentes baratos, e em bons rendimentos globais (35–55%). É importante ressaltar que com exceção do composto **16**, que é comercialmente disponível, e da lactona acetilada **59**, todos os compostos **54-58** e **60-63** são inéditos. Todos os derivados sintetizados por esta rota sintética são sólidos a temperatura ambiente, permitindo a purificação por recristalização. Os compostos **54**, **55**, **61** e **63** foram caracterizados por análise elementar de CHN.

Além do desenvolvimento de uma nova metodologia, estes derivados da D-ribonactona 5-acilados foram preparados com a intenção de avaliar o efeito que diferentes grupos, com características de aceptores e doadores de elétrons ligados ao anel aromático, poderiam exercer sobre a atividade inibitória frente a TcGAPDH glicosossomial. Além disso, as lactonas **59** e **64** foram sintetizados a fim de estimar a necessidade da presença de grupos aroil nos compostos candidatos a inibidores.

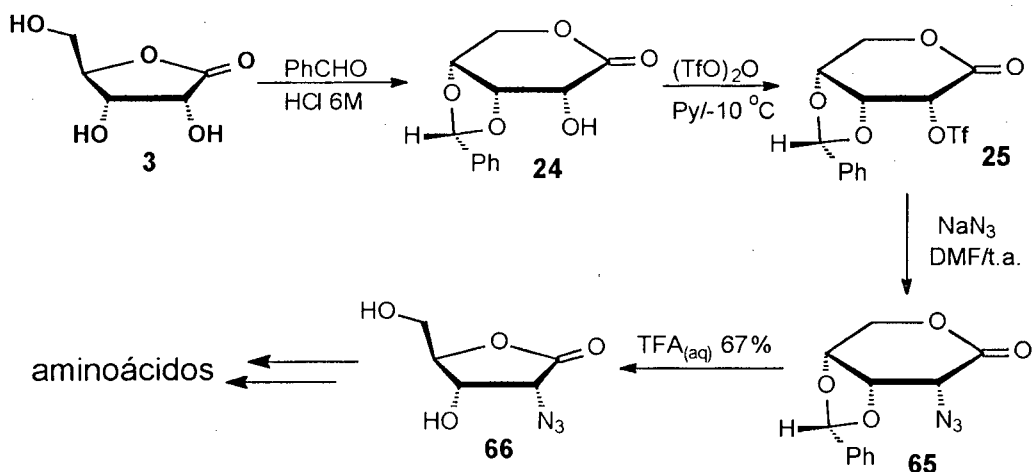


Esquema 22 - Esquema geral para síntese dos derivados 5-acilados.

### 3.2.2 Síntese dos derivados da D-ribolactona seletivamente substituídos na posição 2-

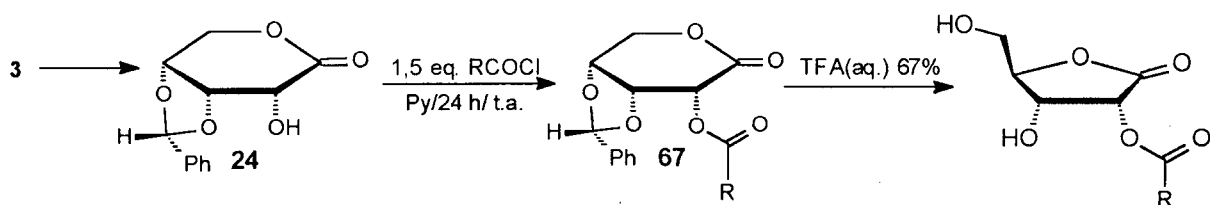
Fleet *et al*<sup>32,33</sup> apresentaram a síntese da azida **66** como precursora de aminoácidos pela rota sintética abaixo (Esquema 23). Este composto foi preparado a partir da D-ribonolactona **3**, que após tratamento com benzaldeído em HCl 6M, forneceu a lactona **24** (conhecida como lactona de Zinner), a qual foi transformada no ribotrifilato **25**, a partir de uma suspensão formada com anidrido trifílico em piridina a -10 °C. A reação de **25** com azoteto de sódio em DMF, resultou na azida

protegida **65**, sem inversão do centro assimétrico em C-2, que finalmente, após hidrólise ácida em TFA 67% do grupo benzilideno protetor, ofereceu o produto esperado **66**.



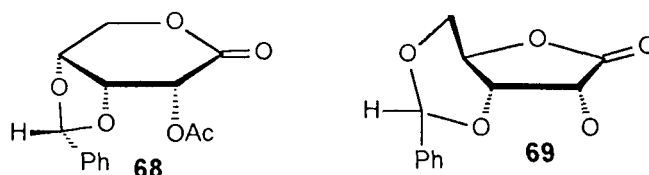
**Esquema 23 - Síntese da azida **66** seletivamente substituída na posição 2- da D-ribonolactona **3**.**

Assim, procurou-se estender a estratégia apresentada por Fleet na síntese da azida **66** visando a preparação de derivados acilados na posição 2- da D-ribonolactona **3** (Esquema 24).



**Esquema 24 - Estratégia para a preparação dos derivados 2-acilados da D-ribonolactona via intermediário **24**.**

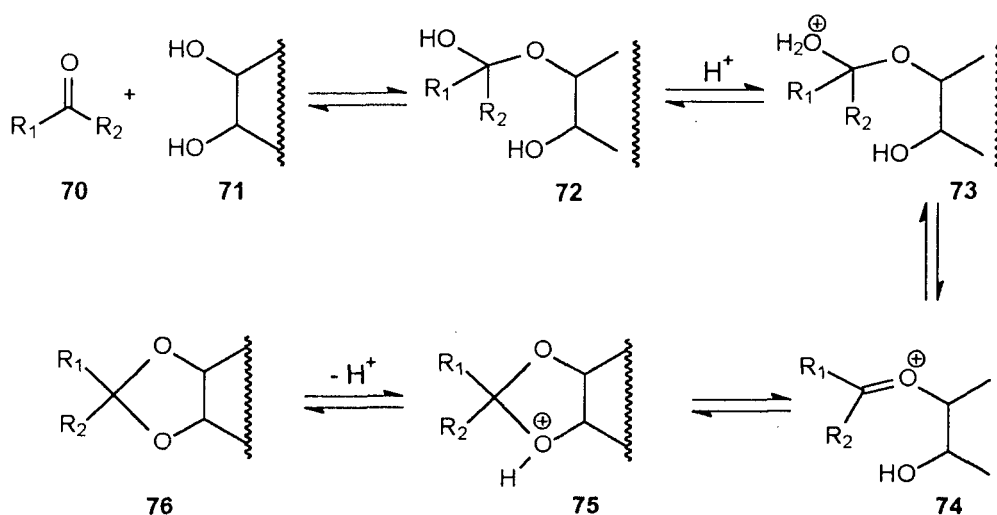
O composto **24** foi alvo de muita discussão na literatura, em função de atribuições errôneas de sua estrutura. Zinner *et al*<sup>41</sup> em seu trabalho pioneiro, propuseram que a estrutura de **24** seria uma 1,4-lactona com o grupo benzilideno ligado aos oxigênios das posições 3- e 5-, (estrutura **69**, Figura 9) proposta esta confirmada de maneira equivocada por Joullié *et al*,<sup>23,25,54</sup> através de análises de RMN-<sup>1</sup>H e preparação de derivados. A correção estrutural foi somente feita por Bagget *et al*<sup>44</sup> por difração de Raio-X, estabelecendo o derivado acetilado de **24** (composto **68**), como sendo uma 1,5-lactona com o grupo benzilideno *endo*. (Figura 9).



**Figura 9 - À esquerda: derivado 68 que teve sua estrutura eluciada por difração de raio-X. À direita: estrutura proposta por Zinner.**

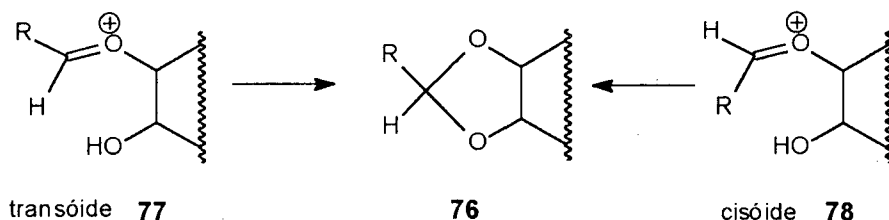
Com a intenção de buscar explicações para a estereoquímica observada para a benzilidação de **3** (estrutura **69**), Joullié *et al* promoveram uma série de estudos.<sup>52,53</sup> Através de cálculos computacionais, foi observado que a formação do isômero *endo* da lactona **24** envolve menor energia (1,15 Kcal/mol) do que a formação do isômero *exo*, dado que corrobora com os resultados experimentais. De fato, todos os compostos seletivamente substituídos na posição 2- da lactona **24** que tiveram suas estruturas elucidadas por difração de Raio-X, apresentaram o grupo benzilideno *endo*.

Joullié *et al.* estudaram a formação de O-benzilideno acetais por meio de monitoramento por RMN-<sup>13</sup>C e afirmaram através destes estudos que a formação do acetal ocorre antes do rearranjo para 1,5-lactona.<sup>52</sup> Ainda, os mecanismos de formação do grupo acetal, a partir da reação entre o diol **71** e um composto carbonilado **70**, deveria proceder através de intermediários hemiacetais **72-74** (Esquema 25), sendo a etapa limitante o fechamento do anel para gerar o acetal protonado **75**, através da reação entre a hidroxila e a carbonila do oxônio em **74**. Desprotonação de **75** resulta no acetal esperado **76**.



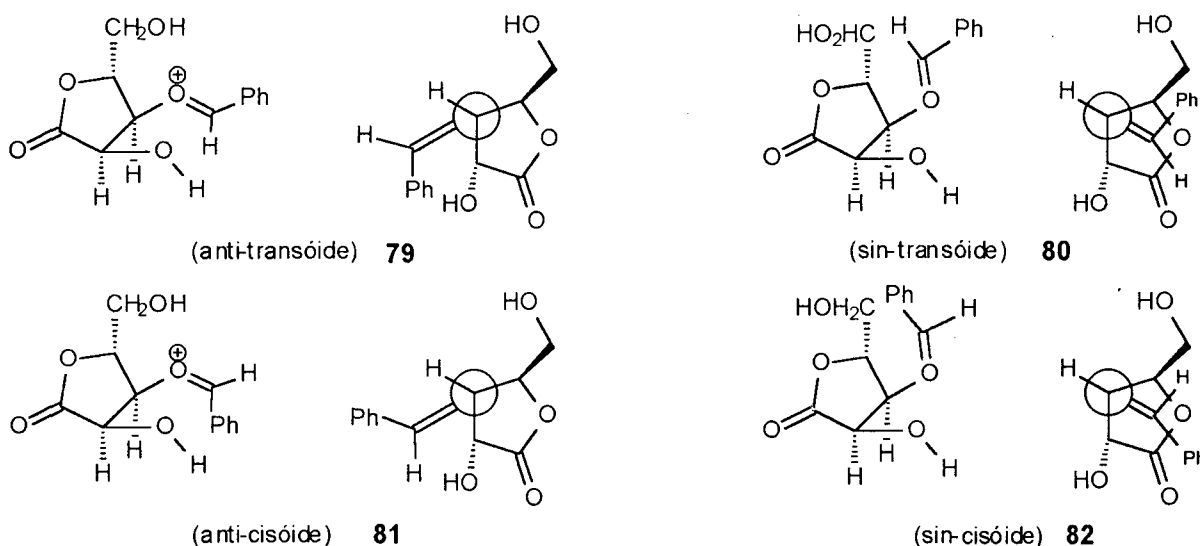
**Esquema 25 – formação do grupo acetal a partir dos hemiacetais 72-74.**

Existe a possibilidade de formação de dois rotâmeros do íon oxônio **74**, chamados de transóide **77** e cisóide **78** (Esquema 26), sendo o rotâmero transóide o mais estável. Clode<sup>55</sup> determinou que rotâmeros com arranjo *anti* de íons oxocarbônio secundários são formados preferencialmente àqueles com arranjo *sin*. Clode postulou ainda que o íon oxocarbônio *anti*-transóide assemelha-se ao estado de transição responsável pela velocidade determinante do processo de acetalização, sendo este o mais estável por razões estéricas.



**Esquema 26 – Rotâmeros transóide 77 e cisóide 78 do íon oxônio 74.**

Joullié propôs quatro íons oxocarbônios como possíveis intermediários (Esquemas 27 e 28), sendo o íon **79** (*anti*-transóide) o mais parecido com o estado de transição para a etapa limitante da reação (Esquema 27).

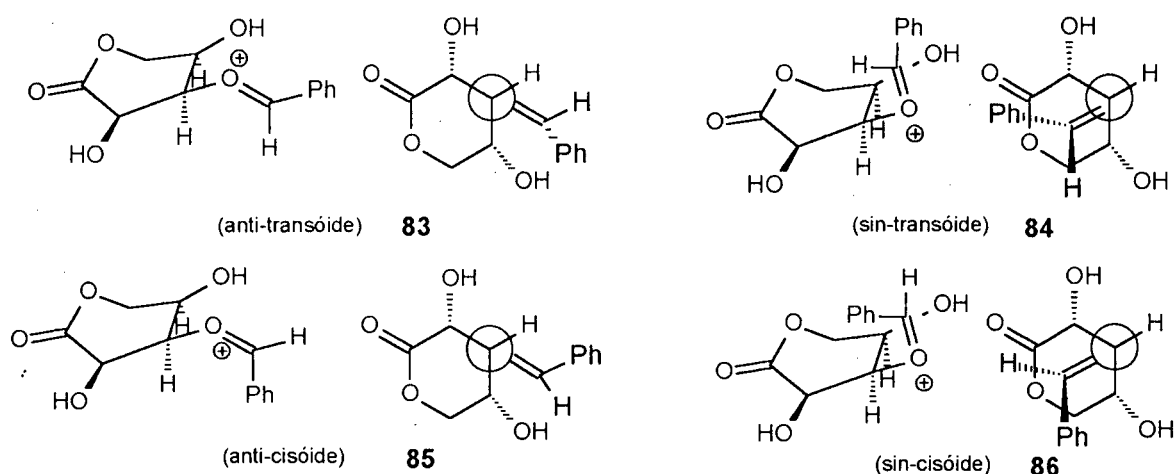


**Esquema 27 - Possíveis intermediários para a formação da 3,4-O-(R)-benzilideno-D-ribono-1,4-lactona 24.**

O mecanismo de migração do grupo acetal da lactona de cinco membros (1,4-lactona) para a de seis membros (1,5-lactona), é menos claro. Observa-se que o



produto *endo* é formado como único diastereoisômero, o que poderia sugerir que a formação do anel rígido (6 membros) ocorra antes da migração do grupo acetal. Esta migração envolve como intermediário, o mesmo íon oxocarbônio, e portanto, o estados de transição energeticamente favorecido assemelha-se ao do íon oxônio tendo a conformação preferida *anti-transóide*. Os quatro possíveis intermediários do sistema 1,5-lactona são mostrados no Esquema 28. Protonação e subsequente abertura da  $\delta$ -lactona deveria levar ao íon **83**, possuindo uma conformação *anti-transóide*, a qual após um rápido fechamento do anel através da reação entre a hidroxila ligada a C-4 e o íon oxônio resulta no acetal *endo*-benzilideno **24** (Esquema 28).



**Esquema 28 - Possíveis intermediários para a formação da 3,4-*O*-(*R*)-benzilideno-D-ribono-1,4-lactona **24**.**

A conformação barco para o anel da lactona do 3,4-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona é confirmada por cristalografia de Raio-X. Os confômeros *sin-transóide* **84** ou *anti-cisóide* **85** são intermediários requeridos para formação do *exo*-benzilideno isômero. Esses íons são muito parecidos com as formas energeticamente menos favorecidas dos estado de transição, e portanto, reações através desses devem ser muito lentas, ou mesmo, não ocorre. A existência do confômero *sin-cisóide* **86** é altamente improvável devido a efeitos estéreis desfavoráveis.<sup>52</sup>

Portanto, conclui-se que, primeiramente, ocorre a formação do 2,3-acetal, seguido de rearranjo de 1,4- para 1,5-lactona e consequente migração do acetal para posição 3,4.

O mecanismo de cetalização da D-ribonolactona **3** com acetona, em meio ácido aquoso, pode ser explicado similarmente (seção 3.2.1.2.1).

### 3.2.2.1 Preparação dos derivados 5-acil-3,4-benzilideno-D-ribonolactona

O composto **24**, foi preparado a partir do procedimento descrito na literatura<sup>25,41</sup>, com rendimento de 85% (literatura  $\approx 70\%$ ).

Os compostos **67**, **87-89**, foram preparados a partir da reação entre a lactona protegida **24** e o respectivo cloreto de acila, em uma solução formada por  $\text{CHCl}_3$  e piridina anidra. Os derivados foram obtidos em bons a excelentes rendimentos.

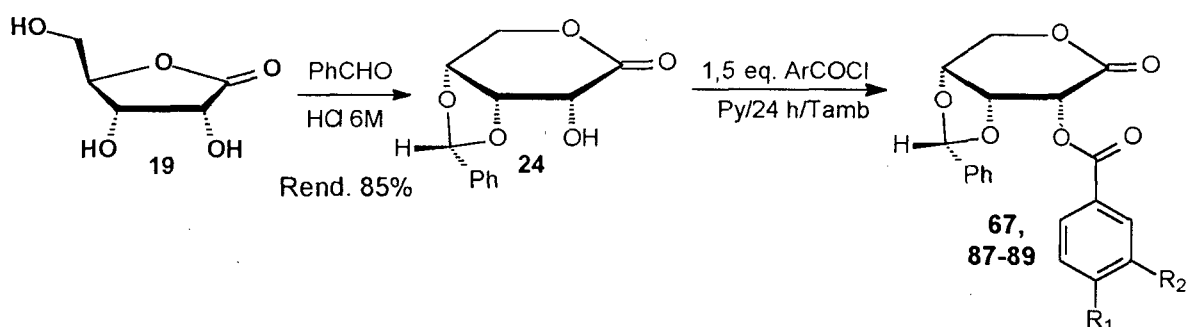


Tabela 7 - Derivados **67,87-89** e seus respectivos substituintes  $R_1$  e  $R_2$ .

Composto	$R_1$	$R_2$	Rend. (%)
<b>67</b>	H	H	85
<b>87</b>	$\text{NO}_2$	H	80
<b>88</b>	$\text{OCH}_3$	H	70
<b>89</b>	Cl	$\text{NO}_2$	80

O espectro de IV para o composto 3,4-O-(*R*)-benzilideno-2-O-(4'-metoxibenzoil)-D-ribono-1,5-lactona **88**, realizado em pastilha de KBr, apresenta duas bandas de intensidade forte em  $1756$  e  $1726\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento  $\text{C}=\text{O}$  de lactona e do grupamento acil. A banda intensa em  $1276\text{ cm}^{-1}$ , é atribuída ao estiramento  $=\text{C}-\text{O}$ , devido a presença do grupo éter aromático do *p*- $\text{OCH}_3$ .

Em princípio, espera-se que os valores obtidos para as carbonilas das lactonas de cinco e seis membros mostrem diferenças consideráveis, e portanto,

espectros de IV poderiam servir para prever as estruturas desses compostos. Por exemplo, a isopropilideno-D-ribonolactona **16** apresenta a carbonila em  $1772\text{ cm}^{-1}$ , enquanto a respectiva banda para a 3,4-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona **24** está em  $1746\text{ cm}^{-1}$ , estando de acordo com os deslocamentos esperados.

Porém, a carbonila para o composto 3,4-*O*-(*R*)-benzilideno-2-*O*-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,5-lactona **87** (6 membros), apresenta-se em  $1772\text{ cm}^{-1}$  (frequência da mesma ordem que a de 5 membros), enquanto que para os compostos 5-*O*-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **61** e 2,3-isopropilideno-5-*O*-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **55** (ambas 5 membros), a carbonila se encontra em  $1762$  e  $1766\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Para confirmar que o composto **87** trata-se de um anel de 6 membros, sua estrutura foi elucidada por difração de Raio-X comprovando que **87** é mesmo  $\delta$ -lactona (Figura 10).

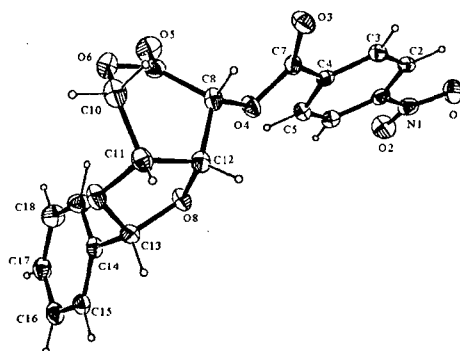


Figura 10 - ORTEP para o composto 3,4-*O*-(*R*)-benzilideno-2-*O*-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,5-lactona **62**.

A seguir são apresentados alguns valores representativos para as carbonilas de éster e de 1,4- e 1,5-lactonas (Tabela 8).

Tabela 8 - IV das carbonilas de éster e de  $\gamma$ - e  $\delta$ -lactonas.

Composto	C=O lactona ( $\text{cm}^{-1}$ )	C=O éster ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b>54</b> (5 membros)	1788	1732
<b>55</b> (5 membros)	1766	1740
<b>60</b> (5 membros)	1770	1716
<b>61</b> (5 membros)	1762	1726
<b>67</b> (6 membros)	1740	
<b>87</b> (6 membros)	1772	1742

Os dados da Tabela 8 indicam que não existe um padrão de frequência para 5/6 membros. Desta forma, a simples inspeção do espectro de IV para as carbonilas

destes derivados da D-ribonolactona **3** não é suficiente para prever se o anel possui cinco ou seis membros.

O espectro de RMN- $^1\text{H}$ , para o composto 3,4-*O*-(*R*)-benzilideno-2-*O*-(4'-metoxibenzoil)-D-ribono-1,5-lactona **88**, em  $\text{CDCl}_3$  como solvente, apresenta os seguintes sinais: um singlete em 3,85 ppm (3 hidrogênios) atribuído aos hidrogênios da metoxila; dois dubletos em 4,43 e 4,63 ppm (2 hidrogênios) relativos a cada hidrogênio do grupo  $\text{CH}_2$ , acoplados entre si ( $^2J=13,4$  Hz); um dubleto em 4,74 ppm referente ao H-4, o qual está acoplado com H-3 ( $^3J=8,2$  Hz); um duplo dubleto em 4,95 ppm identificado como H-3, que por sua vez está acoplado com H-2 e H-4, ( $J=3,1$  e  $8,2$  Hz) respectivamente; um dubleto em 5,75 ppm atribuído ao H-2, com constante de acoplamento  $J=3,1$  Hz acoplado com H-3, um singlete em 5,83 ppm relativo ao CH benzílico; um dubleto em 6,96 ppm (hidrogênios meta) acoplado a um dubleto em 8,10 ppm (hidrogênios orto) com  $J=8,9$  Hz; e finalmente, dois multipletos em 7,41 e 7,51 ppm (3 e 2 hidrogênios) referentes aos hidrogênios do anel aromático do grupamento benzilideno (Figura 11).

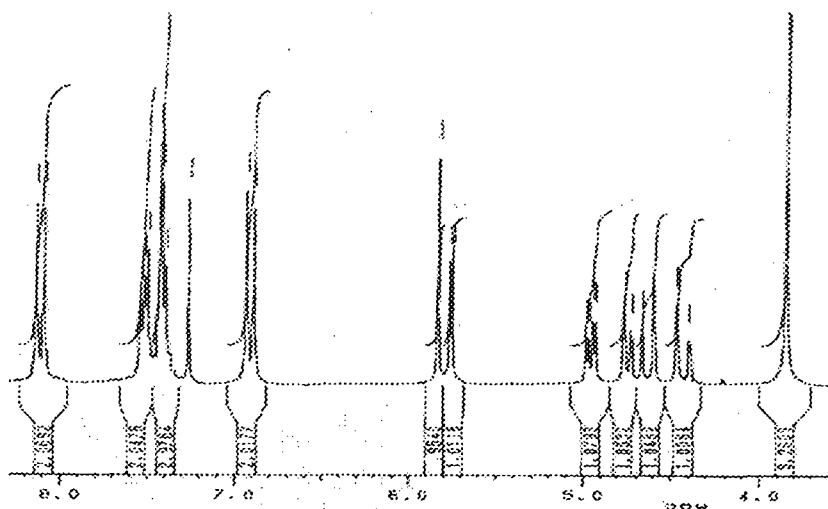


Figura 11 - Espectro de RMN- $^1\text{H}$  para o composto 3,4-*O*-(*R*)-Benzilideno-2-*O*-(4'-metoxibenzoil)-D-ribono-1,5-lactona **88**.

Os demais compostos deste conjunto, apesar de terem sido medidos utilizando  $\text{DMSO}-d_6$  como solvente, possuem um padrão de sinais muito semelhante ao discutido acima (Tabela 9).

**Tabela 9 - Deslocamento químico ( $\delta$ , ppm) dos hidrogênios do anel lactona em DMSO- $d_6$  (24,88) e  $CDCl_3$  (67,87,89).**

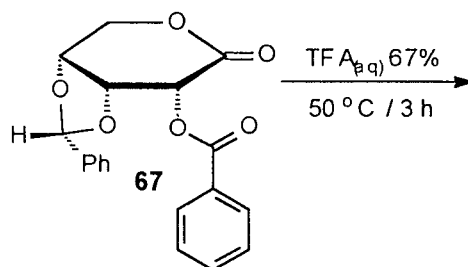
Composto	H-2	H-3	H-4	CH <sub>2</sub>	
<b>24<sup>a</sup></b>	4,62 (dd)	4,63 (dd)	4,69 (dd)	4,42 (dd)	4,43 (d)
<b>67</b>	5,78 (d)	4,97 (dd)	4,74 (d)	4,64 (d)	4,43 (d)
<b>87</b>	6,12 (s)	4,97 (dd)	4,84 (d)	4,75 (d)	4,53 (d)
<b>88</b>	5,75 (d)	4,95 (dd)	4,74 (d)	4,63 (d)	4,43 (d)
<b>89</b>	6,10 (d)	5,02 (dd)	4,83 (d)	4,77 (d)	4,52 (d)

a: Ref.<sup>25</sup>

De maneira análoga ao discutido para os compostos **54-58**, percebe-se através da inspeção dos valores de  $\delta$  contidos na Tabela 10 para os hidrogênios pertencentes ao anel da lactona, que as acilações na posição 2- das 1,5-lactonas, como esperado, deslocaram H-2 em mais de 1 ppm, e H-3 em cerca de 0,4 ppm a campo baixo, quando comparados com **24**. Já os hidrogênios em H-4 e do grupo CH<sub>2</sub>, em virtude de seus maiores distanciamentos do substituinte retirador de elétrons, tiveram seus deslocamentos químicos pouco alterados. Percebe-se também que os hidrogênios de **87** e **89** são os mais desblindados do conjunto, em consequência do substituinte 4'- e 3'-nitrobenzoil, respectivamente. Foram medidos espectros de RMN-<sup>1</sup>H para o composto **87** em  $CDCl_3$  e DMSO- $d_6$ , sendo observadas diferenças mínimas ( $\approx 0,05$  ppm) para os deslocamentos químicos nos dois solventes.

### 3.2.2.2 Hidrólise do grupo benzilideno

A hidrólise do grupo benzilideno do composto **67** foi realizada em uma solução de ácido trifluoroacético 67%, a 50 °C. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando uma mistura de acetato de etila/éter de petróleo 1:1 como eluente. Após 3 h de reação, foram observadas 4 manchas atribuídas ao benzaldeído (subproduto esperado da reação), ácido benzóico (proveniente da oxidação do benzaldeído), material de partida e o produto (uma única mancha). Maior tempo de reação levou à hidrólise do grupo acil, formando a lactona de partida **3**.



**Esquema 29- Hidrólise do grupo benzilideno de 67.**

A partir da análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H, medido em DMSO-d<sub>6</sub>, para o produto oleoso obtido a partir das reação de **67** com TFA 67%, notou-se a presença de dois conjuntos de sinais apresentando integrações distintas, os quais foram caracterizados como sendo referentes a uma mistura de isômeros.

Foram utilizados diferentes solventes a fim de purificar a mistura isomérica, ou conseguir a sua separação. Porém, estas tentativas foram infrutíferas, sendo que os espectros de RMN-<sup>1</sup>H mostravam a mistura de isômeros sempre contaminada com os subprodutos da reação.

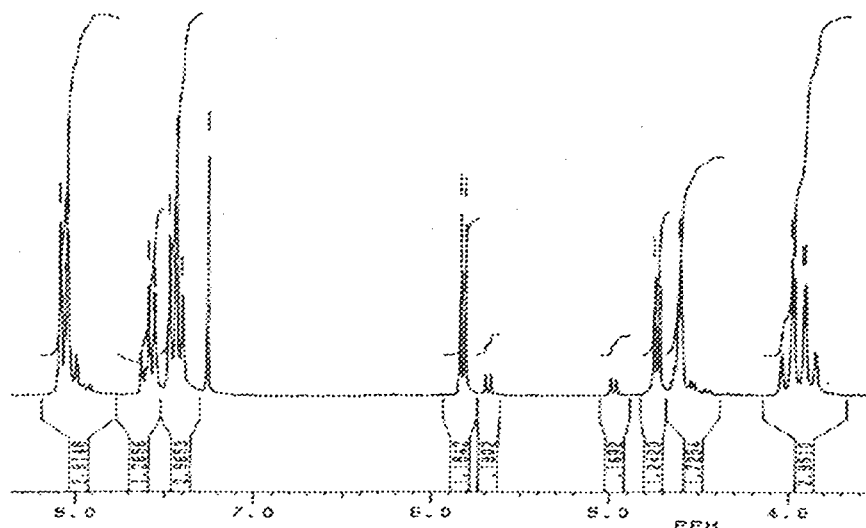
O produto reacional foi então cromatografado em coluna de sílica gel (SiO<sub>2</sub>), utilizando uma mistura de acetato de etila e éter de petróleo 1:1 como eluente, obtendo-se três bandas (Tabela 10).

**Tabela 10 - Bandas de isômeros obtidas a partir das frações da coluna cromatográfica de sílica gel .**

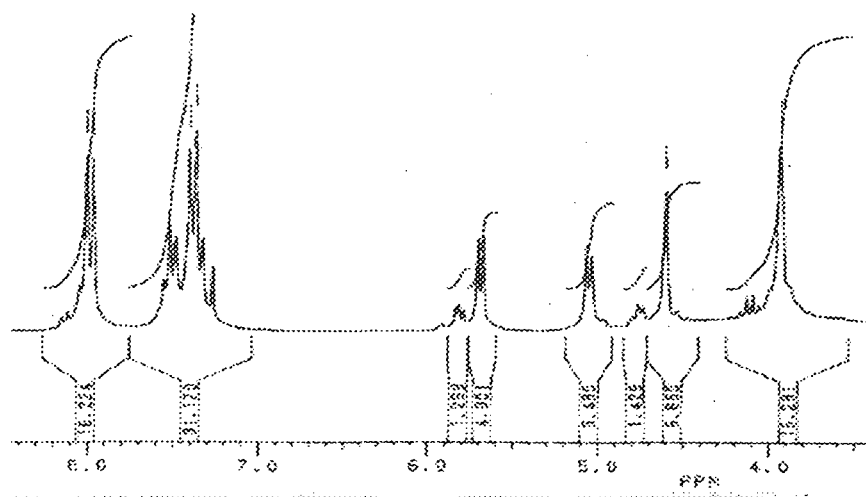
Banda 1	Enriquecida no isômero I
Banda 2	Mistura isomérica I + II
Banda 3	Enriquecida no isômero II

A CCD realizada para as três bandas obtidas a partir das frações da coluna cromatográfica de sílica gel revelou uma única mancha referente a uma mistura de isômeros com R<sub>f</sub>s muito semelhantes.

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H, realizados em CDCl<sub>3</sub>, para a mistura de compostos, foram obtidos a partir de frações da coluna de sílica gel contendo bandas enriquecidas em um dos isômeros (Figuras 12 e 13).



**Figura 12 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para a banda 3 (enriquecida no isômero 2).**

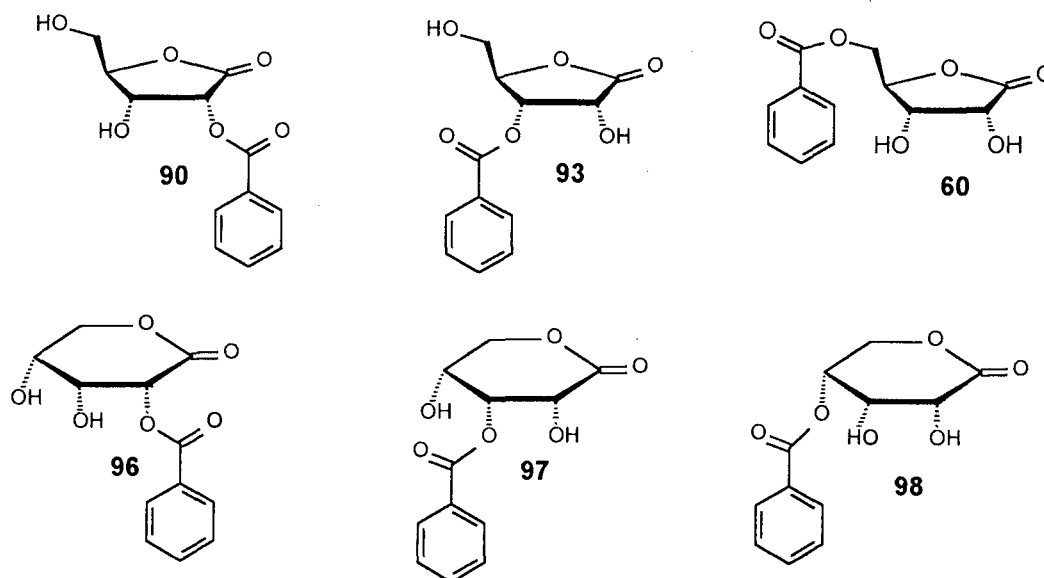


**Figura 13 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para a banda 1 (enriquecida no isômero 1).**

Observa-se, a partir das integrações, e das intensidades relativas dos picos em ambos os espectros de RMN-<sup>1</sup>H, a existência de dois conjuntos distintos de hidrogênios. Nota-se, ainda, ao comparar os espectros, que o conjunto em menor intensidade de um, corresponde exatamente ao grupo de maior intensidade no outro.

É bem sabido que hidroxi ésteres, em particular monoésteres de 1,2- e 1,3-dióis sofrem isomerizações, sendo que estas ocorrem de maneira muito rápida em meio ácido ou alcalino.<sup>56</sup> Portanto, além dos possíveis rearranjos entre 1,4- e 1,5-lactonas, há a possibilidade de existirem migrações dos grupos acil entre os oxigênios das hidroxilas presentes no derivados de carboidrato, e portanto, podem

ser formados seis isômeros diferentes para reação de hidrólise do grupo benzilideno de **67** (Figura 14).



**Figura 14 - Possíveis isômeros para reação de 67 com TFA aquoso 67%.**

O composto **60** (Figura 14) foi sintetizado em rendimento elevado a partir do derivado isopropilideno **54**, em meio ácido. Como foi discutido na seção 3.2.1.2.3, **60** foi caracterizado como uma 1,4-lactona contendo o grupo acil na posição 5-, não sendo observado a formação de qualquer outro produto. Este fato pode ser atribuído a impossibilidade de migração do grupo acil causado pela presença das hidroxilas em trans nas posições 3- e 5-. Ao observar os espectros das Figuras 12 e 13, percebe-se que esses possuem padrões de sinais muito diferentes do espectro de **60** (Figura 7), descartando completamente a possibilidade de sua formação.

Os espectros das Figuras 12 e 13, em  $\text{CDCl}_3$ , mostram os picos referentes ao grupo metileno em torno de 3,8-4,1 ppm, corroborando com o deslocamento para este mesmo grupamento no derivado isopropilideno **16** (1,4-lactona), enquanto que o derivado benzilideno **24** (1,5-lactona), apresenta os hidrogênios referentes ao grupo  $\text{CH}_2$  em 4,4 ppm, estando portanto, aproximadamente 0,5 ppm mais desblindados. Isto indica a possibilidade das estruturas dos produtos serem as 1,4-lactonas **90** e **93**. Apesar disto, este fato ainda não é conclusivo, pois o espectro de **24** foi obtido em  $\text{DMSO-d}_6$ , enquanto os demais espectros foram aferidos utilizando



$\text{CDCl}_3$  como solvente. Porém, pela nossa experiência com aldonolactonas, espectros tirados para um mesmo composto nestes dois solventes, não mostraram diferenças maiores do que 0,1 ppm.

A Tabela 11 apresenta os sinais em maior intensidade referentes aos hidrogênios do anel da lactona obtidos a partir dos espectros das Figuras 12 e 13. Os picos da banda 2 correspondem aos hidrogênios da 2-benzoil lactona **90**, pois espera-se que o sinal referente ao seu H-2 esteja a campo mais baixo de todo o conjunto de hidrogênios, uma vez que este hidrogênio encontra-se  $\alpha$  a carbonila, enquanto que H-3 da 3-benzoil lactona **93** está em  $\beta$  a este grupamento. Consequentemente, o espectro referente a banda 1 corresponde ao composto **93**.

**Tabela 11 - Hidrogênios do anel da lactona para as diferentes frações da coluna de sílica gel para a reação de hidrólise do grupo benzilideno do composto 67.**

Frações	$\delta$ H-2 [multiplicidade; J(Hz)]	$\delta$ H-3 [multiplicidade; J(Hz)]	$\delta$ H-4 [multiplicidade]	$\delta$ CH <sub>2</sub> [multiplicidade]
<b>Banda 1 (93)*</b>	4,98 [d; 6,0]	5,61 [d; 6,0]	4,60 [m]	4,10–3,80 [m]
<b>Banda 2 (90)*</b>	5,73 [d; 5,6]	4,69 [d; 5,6]	4,55 [m]	4,05–3,76 [m]

$\delta$  - ppm; J - Hz; \* sinais em maior intensidade.

Assim, o espectro de RMN-<sup>1</sup>H da Figura 12, em  $\text{CDCl}_3$ , atribuído ao derivado **90**, apresenta os seguintes sinais em maiores intensidades: um multipeto entre 3,76–4,05 ppm (2 hidrogênios), referente aos hidrogênios do grupo CH<sub>2</sub>, um multipeto centrado em 4,55 ppm (1 hidrogênio) atribuído a H-4, um dubleto em 4,69 ppm (1 hidrogênio) com J=5,6 Hz correspondente a H-3, o qual esta acoplado com H-2, um dubleto em 5,73 ppm (1 hidrogênio), J=5,6 Hz, caracterizado como H-2.

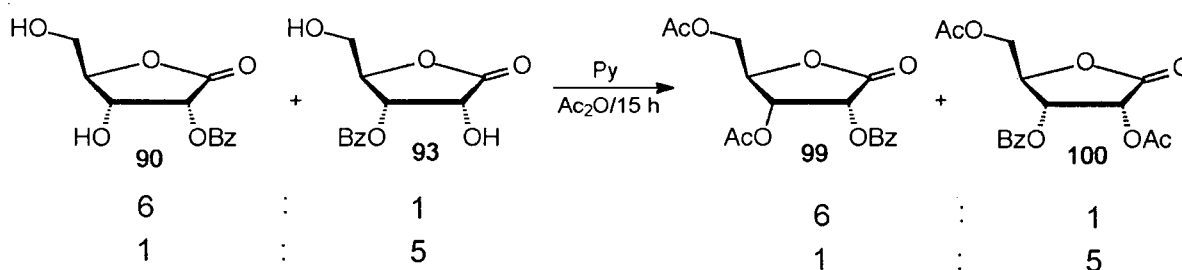
Em virtude da presença de uma pequena quantidade do outro isômero, os hidrogênios aromáticos apresentam uma integração um pouco maior do que a esperada, assim, foi necessário subtrair a parte da integração relativa ao outro composto a fim de determinar as integrações referentes aos hidrogênios aromáticos de **90**. Desta forma, observa-se no referido espectro um tripleto em 7,44 ppm (2 hidrogênios, J=7,3 Hz), referente aos hidrogênios meta, um duplo dubleto em 7,57 ppm (1 hidrogênio, J=1,5 e 7,3 Hz), relativo ao hidrogênio para, e um duplo dubleto em 8,07 ppm (2 hidrogênios, J=1,5 e 7,3 Hz), atribuído aos hidrogênios orto.

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H da Figura 13, em CDCl<sub>3</sub>, correspondente ao derivado **93**, apresenta os seguintes sinais em maiores intensidades: um multipletto entre 3,80-4,10 ppm (2 hidrogênios), referente aos hidrogênios do grupo CH<sub>2</sub>, um multipletto centrado em 4,60 ppm (1 hidrogênio) atribuído a H-4, um dubleto em 4,98 ppm (1 hidrogênio) com J=6,0 Hz correspondente a H-2, o qual esta acoplado com H-3, um dubleto em 5,61 ppm (1 hidrogênio) caracterizado como H-3. O mesmo raciocínio aplicado para identificação das integrações relativas aos hidrogênios aromáticos do espectro anterior, foi praticado para este isômero.

Os acoplamentos existentes entre H-2 e H-3 de ambos isômeros foram confirmados pela técnica de RMN-<sup>1</sup>H em 2D conhecida como COSY, uma vez que esta técnica avalia principalmente os acoplamentos com <sup>2</sup>J, <sup>3</sup>J, e algumas vezes com <sup>4</sup>J, entre os hidrogênios da molécula.

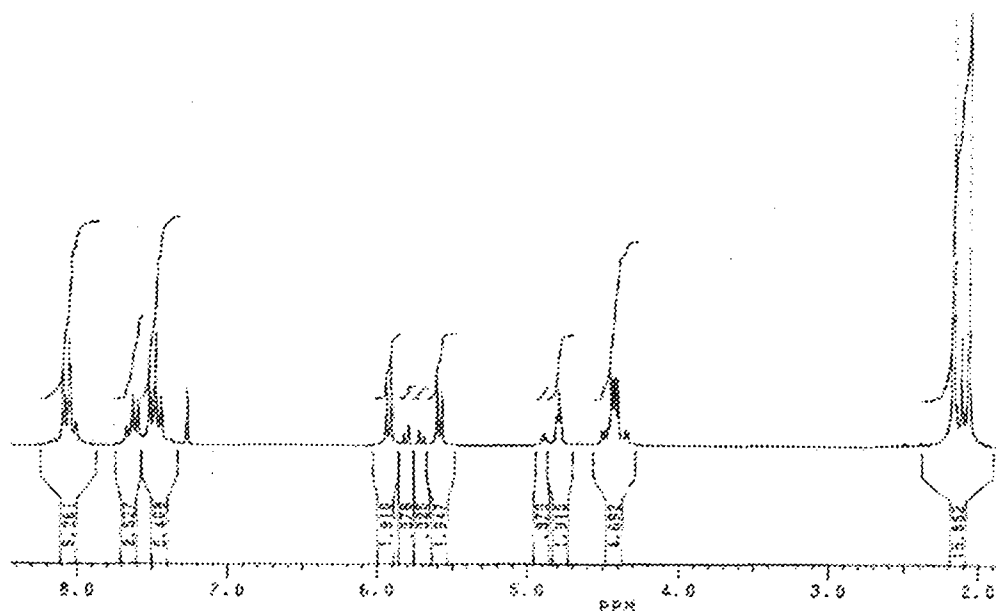
Com a intenção de facilitar a purificação e o isolamento, bem como permitir uma maior caracterização dos isômeros **90** e **93** como 1,4-lactonas, procedeu-se a síntese do derivados acetilados **99** e **100**. Os compostos **90** e **93** são inéditos e, portanto, modelos de deslocamentos químicos são inexistentes. Cabe ressaltar, que **90** e **93** são facilmente acetilados por metodologias gerais e confiáveis, além da acetilação não modificar as ligações C-O e C-C.

Assim, duas frações em diferentes proporções (6:1 e 1:5 de **90/93**) da mistura isomérica foram deixadas reagir em anidrido acético e piridina, durante um período de 15 horas, formando os produtos **99** e **100** como uma mistura de compostos, mantendo as relações de seus materiais de partida. (Esquema 30).

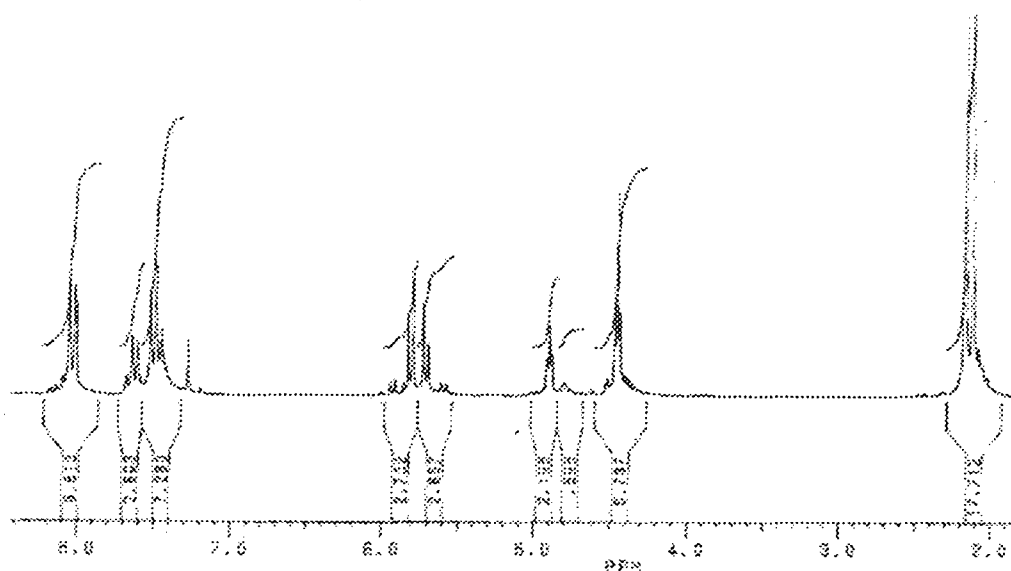


Esquema 30 - Síntese dos derivados acetilados **99** e **100**.

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H, realizados em CDCl<sub>3</sub>, para a mistura de isômeros **99** e **100**, são apresentados a seguir (Figuras 15 e 16).



**Figura 15 – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, em CDCl<sub>3</sub>, para a acetilação da mistura de isômeros 90 e 93 numa proporção de 6:1.**



**Figura 16 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, em CDCl<sub>3</sub>, para a acetilação da mistura de isômeros 90 e 93 numa proporção de 1:5.**

Como observado para os espectros contidos nas Figuras 12 e 13, o conjunto de sinais em maiores intensidades de um dos espectros corresponde exatamente aos sinais de menores intensidades do outro (Figuras 15 e 16).

Nota-se ainda, que as proporções isoméricas dos materiais de partida **90** e **93** foram mantidas nos produtos acetilados **99** e **100**.

Percebe-se, a partir da análise dos dados contidos na Tabela 12, que a acetilação das hidroxilas desblindou consideravelmente ( $\approx 0,9$  ppm para H-2 de **99** e H-3 de **100**) os hidrogênios do anel da lactona dos isômeros **90** e **93**. Nota-se, ainda, que os hidrogênios referentes ao grupo CH<sub>2</sub> nos derivados **99** e **100** estão cerca de 0,5 ppm a campo baixo que os respectivos precursores **90** e **93**. Este fato é mais um indício para confirmar os compostos **90** e **93** como 1,4-lactonas.

Cabe ressaltar, que se as estruturas fossem 1,5-lactonas, esperaríamos um deslocamento em cerca de 1 ppm à campo baixo de dois hidrogênios dos grupos CH referentes ao anel da lactona. Percebe, a partir dos dados da Tabela 12, que somente um único hidrogênio relativo ao grupamento CH da lactona deslocou-se consideravelmente a campo baixo, estando de acordo com as atribuições estruturas feitas (1,4-lactonas).

**Tabela 12 - Sinais de maior intensidade para o anel da lactona dos derivados 90, 93, 99 e 100.**

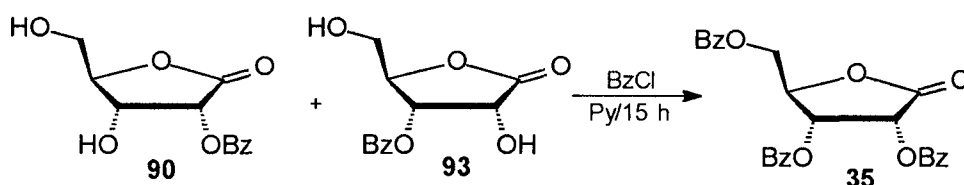
Composto	$\delta$ H-2 [multiplicidade; J(Hz)]	$\delta$ H-3 [multiplicidade; J(Hz)]	H-4 $\delta$ [multiplicidade]	$\delta$ CH <sub>2</sub> [multiplicidade]
<b>90</b>	5,73 [d; 5,6]	4,69 [d; 5,6]	4,55 [m]	4,05–3,76 [m]
<b>99</b>	5,93 [d; 5,8]	5,58 [d; 5,8]	4,81 [m]	4,55–4,30 [m]
<b>93</b>	4,98 [d; 6,0]	5,61 [d; 6,0]	4,60 [m]	4,10–3,80 [m]
<b>100</b>	5,81 [d; 5,8]	5,72 [d; 5,8]	4,81 [m]	4,55–4,30 [m]

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H da Figura 15, apresenta os sinais em maior intensidade correspondentes ao derivado **99**: um conjunto de singletos em 2,0-2,2 ppm (6 hidrogênios) relativo aos hidrogênios do grupo CH<sub>3</sub>, um multiplete entre 4,30-4,55 ppm (2 hidrogênios), referente aos hidrogênios do grupo CH<sub>2</sub>, um multiplete centrado em 4,81 ppm (1 hidrogênio) atribuído a H-4, um dubleto em 5,58 ppm (1 hidrogênio) com J=6,0 Hz correspondente a H-2, o qual está acoplado com H-3, um dubleto em 5,93 ppm (1 hidrogênio, J=6,0 Hz) caracterizado como H-3, um triplete em 7,45 ppm (2 hidrogênios, J=7,3 Hz) referente aos hidrogênios meta, um dubleto em 7,58 ppm (1 hidrogênio, J=7,3 Hz) relativo ao hidrogênio para, e um dubleto em 8,06 ppm (2 hidrogênios, J=7,3 Hz) atribuídos ao hidrogênios orto.

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H da Figura 16, em CDCl<sub>3</sub>, demonstra os sinais em maior intensidade referentes ao isômero **100**: um conjunto de sinais em 2,0-2,2 ppm (6 hidrogênios) relativo aos hidrogênios do grupo CH<sub>3</sub>, um multiplete entre 4,30-4,55

ppm (2 hidrogênios), referente aos hidrogênios do grupo CH<sub>2</sub>, um multiplete centrado em 4,81 ppm (1 hidrogênio) atribuído a H-4, um dubleto em 5,72 ppm (1 hidrogênio) com J=5,6 Hz correspondente a H-3, o qual está acoplado com H-2, um dubleto em 5,81 ppm (1 hidrogênio), J=5,6 Hz, caracterizado como H-2, um triplete em 7,46 ppm (2 hidrogênios, J=7,1 Hz) referente aos hidrogênios meta, um duplo dubleto em 7,60 ppm (1 hidrogênio, J=1,5 e 7,1 Hz) relativo ao hidrogênio para, e um duplo dubleto em 8,08 ppm (2 hidrogênios, J=1,5 e 7,1 Hz) atribuído aos hidrogênios orto.

Outro derivado preparado a partir dos isômeros **90** e **93** que confirma os produtos de hidrólise como 2-benzoil-D-ribonolactona **90** e 3-benzoil-D-ribonolactona **93** é o composto perbenzoilado **35**. Uma mistura em proporções semelhantes dos isômeros **90** e **93**, foi tratada com cloreto de benzoila em piridina, obtendo-se um único composto, caracterizado como sendo o 2,3,5-O-tribenzoil-D-ribono-1,4-lactona **35**, corroborando com as atribuições estruturais feitas para as lactonas **90** e **93** (Esquema 31).



Esquema 31 - Síntese do derivado **35** a partir dos isômeros **90** e **93**.

Portanto, das seis estruturas possíveis para a reação de hidrólise do grupo benzilideno de **67**, pode-se eliminar quatro, ou seja, as 1,5-lactonas **97-99** e a 5-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **60**, restando **90** e **93** (Figura 17), o que está de acordo com o fato de serem observados somente dois conjuntos de sinais nos espectros de RMN-<sup>1</sup>H, o que foi confirmado preparando-se os derivados diacetilados e perbenzoilados.

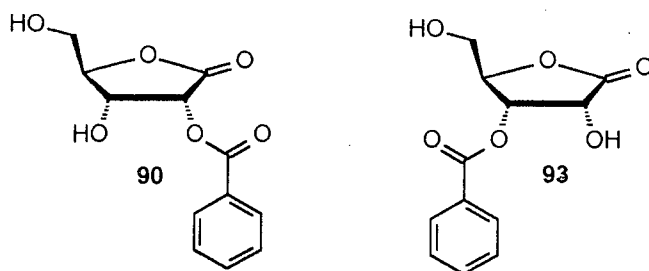
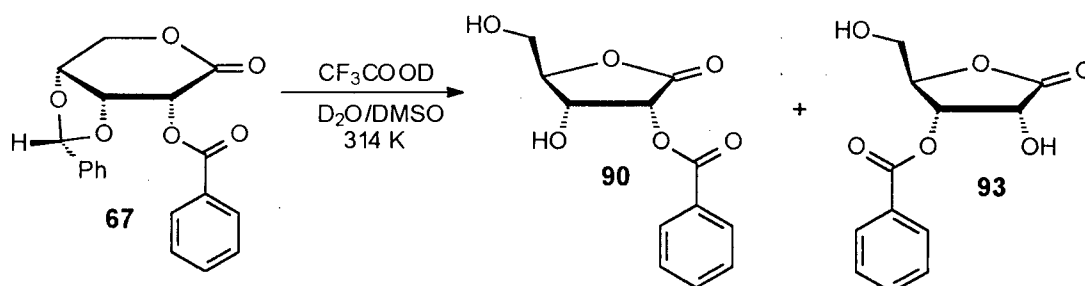


Figura 17 - Compostos formados a partir da reação entre **67** e TFA 67%.

Com a intenção de entender o processo de formação dos isômeros **90** e **93**, acompanhou-se a hidrólise do grupo benzilideno de **67** por RMN- $^1\text{H}$ , utilizando  $\text{CF}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$  como solvente. Foi necessário a adição de algumas gotas de  $\text{DMSO-d}_6$  para ajudar a solubilização da lactona **67**, pois devido a problemas operacionais, não foi possível realizar o ajuste da temperatura do aparelho em valores superiores a  $41\text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura na qual **67** é pouco solúvel em  $\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOH}$ .

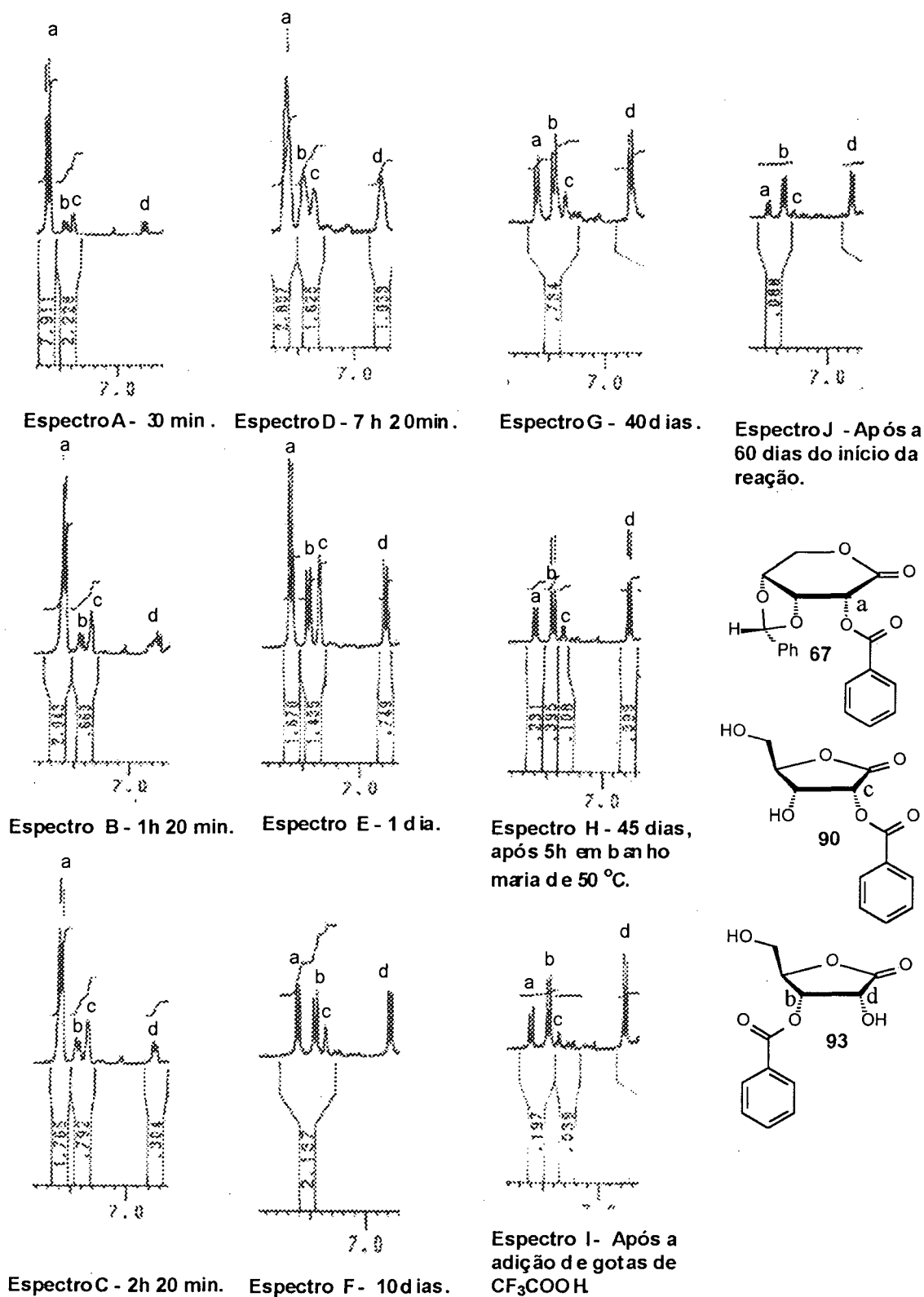
Devido à presença de uma mistura de solventes, não foi possível realizar a calibração dos sinais. Assim, escolheu-se o pico referente ao  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , em  $11,60\text{ ppm}$ , como padrão interno para o experimento.



**Esquema 32 - Reação de hidrólise realizada em tudo de RMN.**

Os espectros de RMN- $^1\text{H}$ , a  $41\text{ }^\circ\text{C}$ , foram realizados após 15 min, 30 min, 50 min, 1 h 20 min, 2 h 20 min, 3 h 50 min, 5 h 20 min e 7 h 20 min, então retirou-se o tubo do aparelho de RMN mantendo-o a temperatura ambiente. Foram tirados novos espectros para a reação após 1, 10 e 40 dias. Depois de 45 dias, aferiu-se a amostra após deixar o tubo em banho maria à temperatura de  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , durante 5 h. O espectro foi novamente medido, após à adição de algumas gotas de  $\text{CF}_3\text{COOH}$ .

A seguir, são apresentados os espectros mais representativos para a experiência descrita acima (Figura 18).



**Figura 18 - Espectros obtido para a hidrólise do grupo benzilideno de 67 em tubo de RMN.**

Ao observar os espectros A-J contidos na Figura 18, percebe-se quatro sinais e suas respectivas atribuições (ver legenda na Figura acima). Devido à mistura de

solventes utilizadas no experimento, os hidrogênios b e c mudaram de posição entre si. Assim, tem-se o pico referente a H-2 do material de partida **67** (a), seguido de H-3 do composto **93** (b), H-2 do isômero **90** (c), e a campo mais alto, H-2 de **93** (d). Os dubletos referentes aos hidrogênios b e d estão acoplando com  $J=5,9$  Hz, confirmando as atribuições feitas para os hidrogênios.

Para facilitar a discussão, em todos os casos considerou-se a seguinte proporção b:c. Nas primeiras horas da reação (Espectros A-C), os hidrogênios dos isômeros são formados numa proporção de 2:3, levando a crer que logo em seguida à hidrólise do grupo benzilideno acontece um rearranjo para 1,4-lactona com consequente ataque do grupo hidroxil ligado a C-3, formando assim o composto 3-benzoilado **93**. Após 7 h e 40 min o tubo foi retirado do aparelho de RMN e mantido a temperatura ambiente. Percebe-se, a partir da análise dos espectros D e E, que após um dia, ocorreram poucas alterações, porém, passados 10 dias do início da reação (espectro F), nota-se que as proporções entre os isômeros alteraram-se significativamente, tornando-se 3:1. Isto indica que a migração do grupo acil passou a ser mais rápida do que a hidrólise do grupo benzilideno.

Observa-se que entre o décimo e o quadragésimo dia (Espectros F e G) praticamente não ocorreu modificação no pico relativo ao material de partida, nota-se apenas um pequeno aumento das proporções isoméricas. Este fato é atribuído a evaporação do  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , corroborando com o fato observado para os espectros D e E. Percebe-se que mesmo aumentando a temperatura da reação, o dubleto referente a **67** (a) permaneceu quase inalterado (Espectros G e H).

A adição de mais algumas gotas de  $\text{CF}_3\text{COOH}$  não modificou os hidrogênios em discussão (Espectro I), porém, os picos a campo mais alto intensificaram-se (não são mostrados nos espectros em discussão), dando sinais de que o grupo benzoil dos isômeros começou a sofrer hidrólise, formando assim a D-ribonolactona **3**.

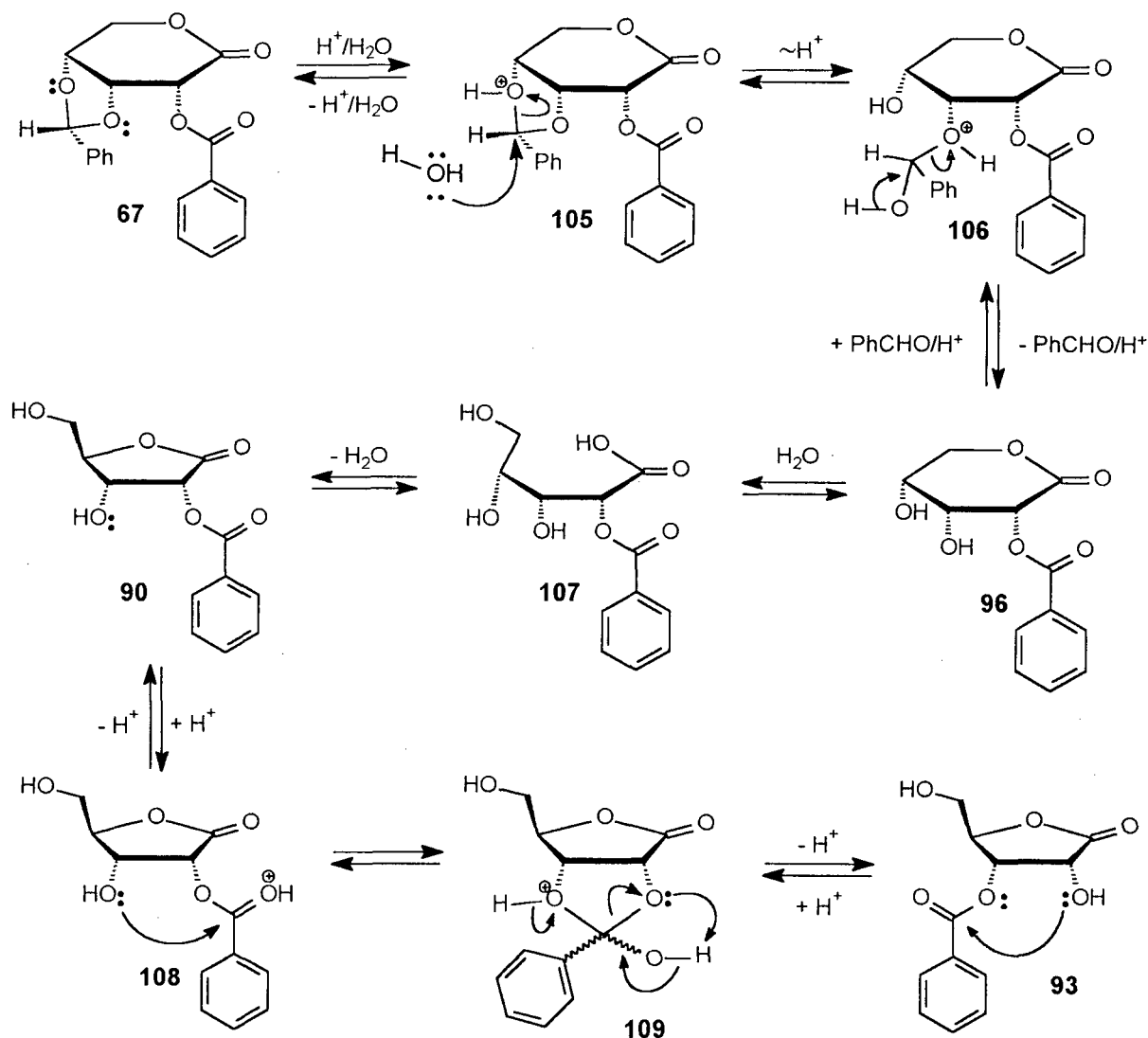
Finalmente, após 60 dias do início do experimento, praticamente todo o material de partida e o isômero **90** transformaram-se no composto 3-benzoilado **93**.

Foi realizada ainda uma experiência envolvendo misturas contendo predominantemente um dos isômeros, a fim de verificar se haveriam alterações nas razões isoméricas após o tratamento de cada fração com TFA aquoso 50%, a 50 °C. De fato, a partir da análise dos espectros de RMN- $^1\text{H}$ , foram observadas modificações nas proporções dos hidrogênios referentes aos isômeros, porém a



hidrólise dos grupos acil para formação da D-ribonolactona **3** parece ser predominante.

Portanto, conclui-se que, após a hidrólise do grupo benzilideno em **67** há uma rápida isomerização de 1,5-lactona **96** para 1,4-lactona **90** seguido de ataque do grupo hidroxil vizinho ao benzoil, formando o produto 3-benzoilado **93** (Esquema 33).



**Esquema 33** - Mecanismo proposto para hidrólise do grupo benzilideno seguido de migração do grupo acil.

Foram realizados ainda, os espectros de RMN- $^1H$  para as reações de hidrólise do grupo benzilideno de **87** e **88** sem maiores purificações. Assim como foi observado para a hidrólise do grupo benzilideno de **67** em meio ácido, as reações dos compostos **87** e **88** com TFA aquoso também mostraram a formação de uma mistura de isômeros (Figuras 19-21 e tabela 13).

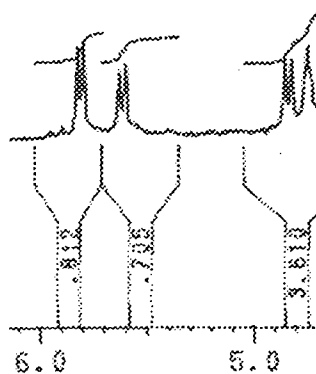


Figura 19- Espectro de RMN- $^1\text{H}$  para a reação de 67 e TFA aquoso 67%, sem maiores tratamentos.

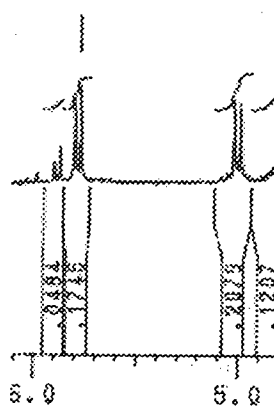


Figura 20 - Espectro de RMN- $^1\text{H}$  para a reação entre 87 e TFA aquoso 67%, sem maiores tratamentos.

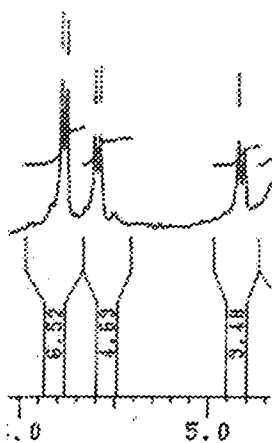
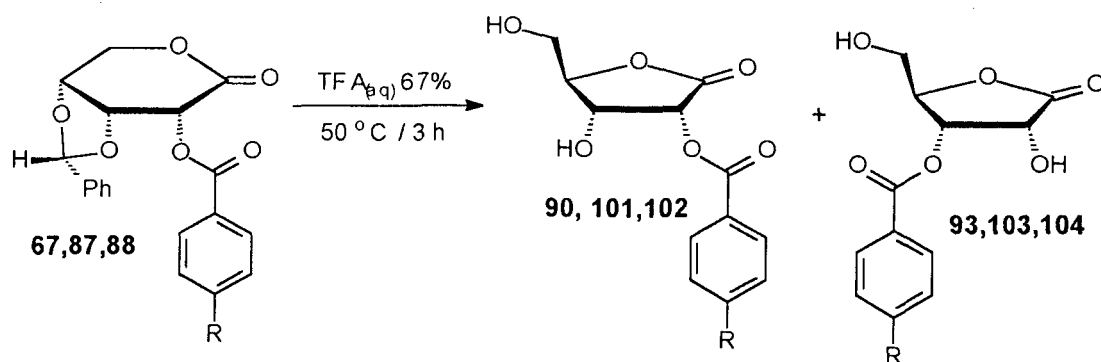


Figura 21 - Espectro de RMN- $^1\text{H}$  para a reação entre 88 e TFA aquoso 67%, sem maiores tratamentos.



**Tabela 13 - Derivados e seus respectivos substituintes R.**

Composto	R	2-acil:3-acil
<b>67,90,93</b>	H	1:1
<b>87,101,103</b>	NO <sub>2</sub>	3:1
<b>88,102,104</b>	CH <sub>3</sub> O	1:1,5

O sinal a campo baixo e a campo mais alto nas Figuras 19-21, são referentes a H-2 e H-3 do isômero **2-acilado**, respectivamente, enquanto que o pico central é atribuído a H-3 do composto **3-acilado**.

Nota-se, a partir das integrações relativas aos dois isômeros em cada espectro (Figuras 19-21), que os derivados **90** e **93** (R=H) são formados em proporções semelhantes, já os compostos **101** e **103** (R=NO<sub>2</sub>) são produzidos numa relação de 1:3, devido a maior reatividade causada pelo grupo nitro em para no anel do grupo acilante, e finalmente, os compostos **102** e **104** (R=OCH<sub>3</sub>), são gerados numa proporção de 1,5:1, em virtude da presença do grupo doador de elétrons no núcleo aromático do éster. Porém, um estudo de RMN-<sup>1</sup>H semelhante ao desenvolvido para o composto **67** poderia determinar se a distribuição dos produtos corresponde a proporção de cada um deles ao atingir o equilíbrio.

### 3.2.2.3 Procedimento alternativo para preparação de derivados seletivamente acilados na posição 2-

A literatura apresenta inúmeros procedimentos para abertura de acetais cíclicos.<sup>57</sup> Foram realizadas uma grande quantidade destas metodologias, tentando adaptá-las para os compostos apresentados neste trabalho.

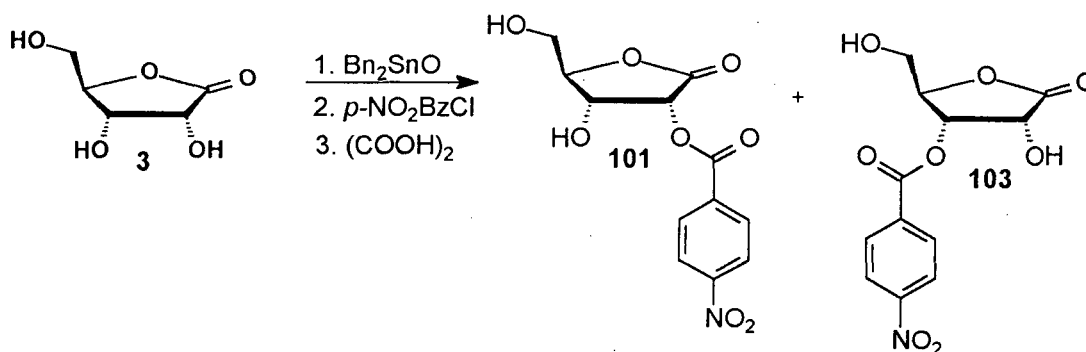
A seguir, são apresentados algumas destas tentativas para abertura do grupo benzilideno:

a) hidrogenação catalítica:<sup>58</sup> utilizou-se Pd/C como catalisador em diferentes pressões (1 – 3 atm), em solventes como acetona, acetato de etila e misturas como acetona:clorofórmio 4:1. Em todos os casos, o material de partida foi totalmente recuperado.

b) I<sub>2</sub>/MeOH:<sup>59</sup> o composto **67** foi deixado em refluxo em uma solução formada por I<sub>2</sub> saturado em metanol. Diluição do produto formado em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e subsequente tratamento com uma quantidade mínima de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aquoso forneceu um óleo cuja CCD revelou a formação de três manchas. O espectro de RMN-<sup>1</sup>H indicou a presença de carboidratos, porém, estando contaminado com subprodutos. Este procedimento apresentou a desvantagem de um tratamento com Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aquoso, uma vez que os produtos esperados são muito solúveis em água, o que leva a um baixo rendimento reacional.

A utilização de organoestananos para alquilações, acilações e oxidações diretas de polióis, bem como de nucleotídeos, nucleosídeos e carboidratos, é bastante comum.<sup>56,60,61</sup> Porém, seu emprego para derivados da ribose ainda não foi relatada. Dessa maneira, uma rota sintética alternativa foi desenvolvida utilizando óxido de dibutilestanho para a formação de um intermediário estanilado, onde pretendia-se promover a acilação na posição 2- ou 3- da D-ribonolactona **3**.

Uma solução formada pela D-ribonolactona **3**, Bn<sub>2</sub>SnO e tolueno, foi destilada em Dean-Stark, durante 10 horas, para formar o intermediário estanilado. Em seguida, gotejou-se uma solução de cloreto de *p*-nitrobenzoila em CHCl<sub>3</sub> à reação, e então deixou-se a mistura sob agitação por 4 horas. Finalmente, adicionou-se ácido oxálico à solução produzindo um complexo com estanho insolúvel no meio reacional, liberando assim, a porção do carboidrato (Esquema 34).



Esquema 34 - Síntese dos derivados 101 e 103 por uma rota alternativa.

Apesar do complexo formado ser insolúvel, foi somente possível eliminar 80% deste por filtração. Mesmo após inúmeras recristalizações, o produto esperado encontrava-se contaminado com esse derivado estanilado. Consequentemente, foi necessário filtrar o produto oleoso resultante da reação em uma coluna de sílica gel. O espectro de RMN- $^1\text{H}$  obtido a partir da coluna cromatográfica é apresentado na Figura 22.

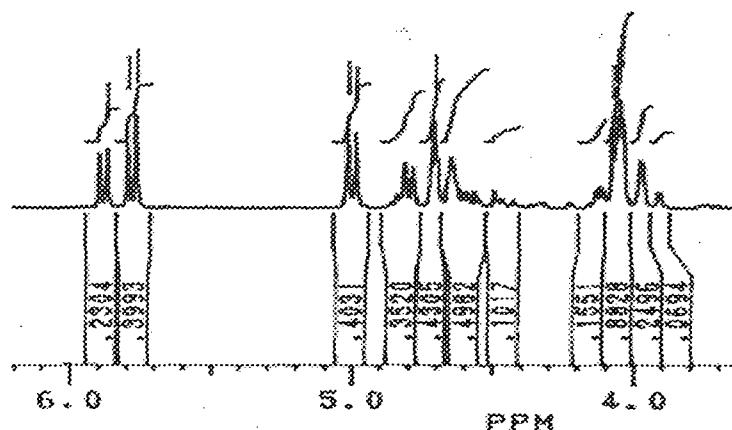


Figura 22 - Espectro de RMN- $^1\text{H}$  para a mistura de isômeros **101** e **103**.

O espectro mostrado na Figura 22 é referente a uma das frações da coluna, porém a soma dos compostos pertencentes a cada uma das frações revelou a mesma proporção isomérica encontrada para a hidrólise de **87**. Este fato também serve como indicativo para a atribuição dos conjuntos de picos.

Devido a presença de subprodutos, a porção do espectro relacionada aos grupos aromáticos foi omitida na Figura 22, e portanto, será discutida apenas a região referente aos hidrogênios do anel da lactona.

Assim como foi observado para o espectro dos isômeros **101** e **103** obtidos a partir da reação entre a benzilideno lactona **87** e TFA 67%, nota-se a presença de dois conjuntos de sinais em intensidades diferentes. Os sinais em menores proporções foram caracterizados como correspondentes aos hidrogênios do anel da lactona **101**, pois H-2 de **101**, por estar  $\alpha$  a carbonila, deve aparecer a campo mais baixo do conjunto (Tabela 14).

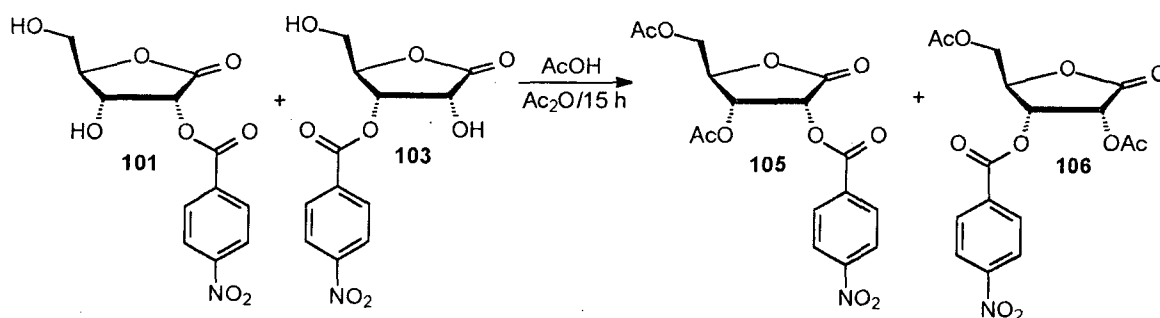
**Tabela 14 - Protões referentes ao anel da lactona dos isômeros 101 e 103.**

Composto	$\delta$ H-2 [multiplicidade; J(Hz)]	$\delta$ H-3 [multiplicidade; J(Hz)]	$\delta$ H-4 [multiplicidade]	$\delta$ CH <sub>2</sub> [multiplicidade]
<b>101</b>	5,88 [d;6,2]	4,82 [d;6,2]	4,65 [m]	3,95 [m]
<b>103</b>	5,00 [d;6,1]	5,78 [d;6,1]	4,71 [m]	4,05 [m]

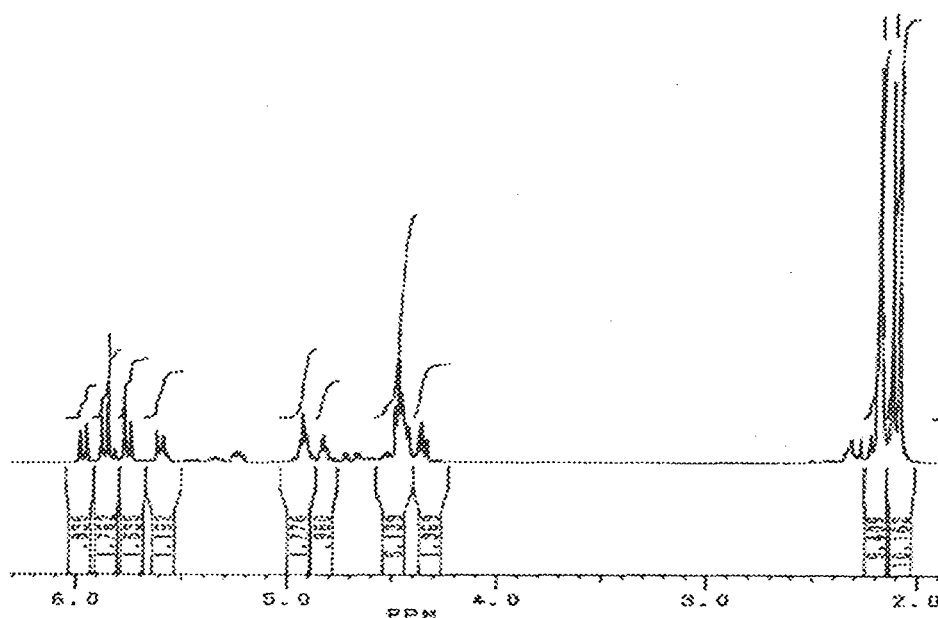
O espectro bruto da Figura 22, em CDCl<sub>3</sub>, mostra multipletos referentes ao grupo metileno de ambos isômeros em torno de 3,95-4,05 ppm, corroborando com as atribuições estruturais feitas (1,4-lactona). Observam-se os seguintes sinais para o anel da 2-acil lactona **101** (menor intensidade): um multipeto em 3,95 ppm (2 hidrogênios), referente aos hidrogênios do grupo CH<sub>2</sub>, um multipeto em 4,65 ppm (1 hidrogênio) atribuído a H-4, um dubleto em 4,82 ppm (1 hidrogênio) com J=6,2 Hz correspondente a H-3, o qual está acoplado com H-2, e, um dubleto em 5,88 ppm (1 hidrogênio, J=6,2 Hz), caracterizado como H-2.

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H da Figura 22, mostra picos em maiores intensidades referentes aos hidrogênios do anel do 3-acil isômero **103**. Assim, tem-se: um multipeto em 4,05 ppm (2 hidrogênios), referente aos hidrogênios do grupo CH<sub>2</sub>, um multipeto centrado em 4,71 ppm (1 hidrogênio) atribuído a H-4, um dubleto em 5,00 ppm (1 hidrogênio) com J=6,1 Hz correspondente a H-2, o qual está acoplado com H-3, e um dubleto em 5,78 ppm (1 hidrogênio, J=5,6 Hz), caracterizado como H-3.

A fim de confirmar as atribuições estruturais para os compostos formados na presente reação, procedeu-se a acetilação dos grupos hidroxil a partir do tratamento de uma fração da coluna contendo os isômeros **101** e **103**, numa proporção de 1:2,5, com uma solução formada por anidrido acético e ácido acético. Porém, mesmo após sucessivas recristalizações, não foi possível purificar o óleo resultante da reação, e portanto, somente serão discutidos os valores de hidrogênios referentes ao anel da lactona.



**Esquema 35 - Síntese dos derivados acilados dos isômeros 101 e 103.**



**Figura 23 – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H para acetilação da mistura de isômeros 105 e 106.**

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H, realizado em CDCl<sub>3</sub>, presente na Figura 23 mostra, que o padrão de sinais é muito parecido ao encontrado para a acetilação dos isômeros **90** e **93** (Figuras 15 e 16). Observa-se, ainda, a existência de dois grupos de picos em razões isoméricas semelhantes a de seus respectivos materiais de partida (Tabela 15).

**Tabela 15 - Hidrogênios do anel da lactona para os compostos 101, 103, 105, 106.**

Composto	δ H-2 [multiplicidade; J(Hz)]	δ H-3 [multiplicidade; J(Hz)]	δ H-4 [multiplicidade]	δ CH <sub>2</sub> [multiplicidade]
<b>101</b>	5,88 [d; 6,2]	4,82 [d; 6,2]	4,65 [m]	3,95 [m]
<b>105</b>	5,98 [d; 6,1]	5,60 [d; 6,1]	4,93 [m]	4,48 [m]
<b>103</b>	5,00 [d; 6,1]	5,78 [d; 6,1]	4,71 [m]	4,05 [m]
<b>106</b>	5,75 [d; 6,2]	5,72 [d; 6,2]	4,84 [m]	4,36 [m]

Percebe-se, a partir da análise dos dados contidos na Tabela 15, que a acetilação das hidroxilas desblindou todos os hidrogênios do anel da lactona dos isômeros **101** e **103**. Nota-se ainda, que os hidrogênios referentes ao grupo CH<sub>2</sub>, após a acetilação, deslocaram-se cerca de 0,4 ppm a campo baixo. Este fato é mais um indício para confirmar os compostos **101** e **103** como 1,4-lactonas.

Os resultados da hidrólise da acil-benzilideno-1,5-lactona e a acilação direta da D-ribonolactona levam a resultados semelhantes, ou seja, misturas de 2-acil + 3-acil.

### **3.3 Desenvolvimento de moléculas candidatas a fármacos**

Ao sintetizar novas moléculas visando o tratamento de alguma doença específica, é comum que a potência seja a única propriedade a ser levada em consideração. Porém, parâmetros de solubilidade, biodisponibilidade e permeabilidade também devem ser considerados, principalmente quando se pretende produzir um medicamento de uso oral. Dessa forma, sua ação farmacológica será tão importante quanto os fenômenos de absorção e distribuição que serão analisados em fases farmacocinéticas do descobrimento de fármacos. Com base nesses conceitos, Lipinsky formulou uma regra que estabelece que substâncias candidatas a fármacos devem possuir massa molecular até 500 g/mol, não devem apresentar soma de número de átomos de N e O maior do que dez, nem número de átomos capazes de realizar ligação de hidrogênio superior a cinco.<sup>11</sup>

No presente trabalho procurou-se avaliar a atividade inibitória *in vitro* dos derivados de carboidratos sintetizados frente à TcGAPDH glicossomial, como um estudo preliminar para identificar potenciais candidatos a um posterior desenvolvimento das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

Praticamente, todos os derivados de carboidratos submetidos aos testes de inibição preencheram os requisitos básicos de um candidato a fármaco, ou seja, possuir massa molecular menor que 500 g/mol, apresentar soma de átomos de N e O menor do que dez, e número de átomos capazes de realizar ligação de hidrogênio inferior a cinco.

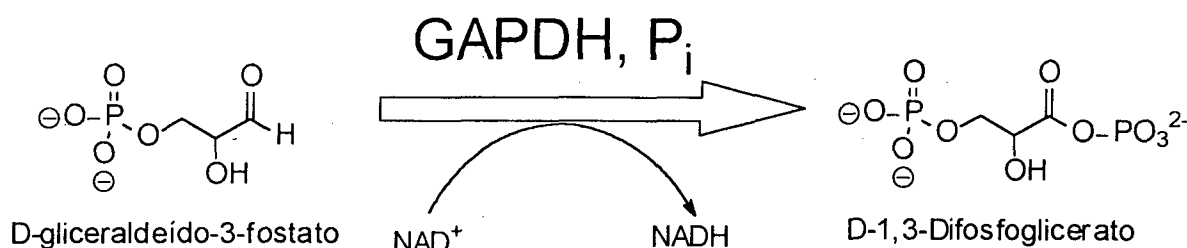
#### **3.3.1 Ensaios biológicos**

Os derivados apresentados nesta dissertação foram submetidos aos testes de inibição enzimática frente à gGAPDH de *T. cruzi*. A coordenação dos testes de inibição enzimática está sob a responsabilidade do Prof. Glaucius Oliva, do



Laboratório de Cristalografia e Biologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP).

A enzima gGAPDH catalisa a seguinte reação:<sup>14,62</sup>



A atividade da enzima é monitorada através de técnica espectrofotométrica pela absorção em 340 nm do NADH formado ao longo de 30 segundos. A atividade específica da enzima pura é 150 mM de NADH formado por mg/min.<sup>62</sup>

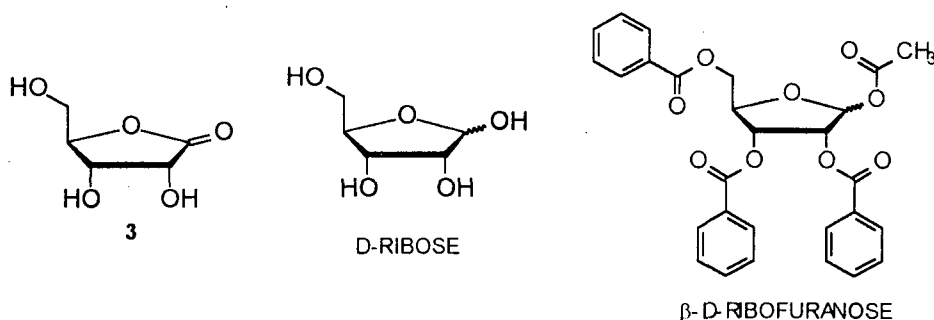
Infelizmente, por motivos de solubilidade, não foi possível estabelecer os valores de IC<sub>50</sub> para todos os derivados sintetizados, portanto, as porcentagens apresentadas em todas as Tabelas representam a inibição enzimática em uma solução saturada do respectivo composto. Mas, essas determinações mostram-se desnecessárias, uma vez que esses compostos necessitariam de concentrações muito elevadas para atingir os valores de IC<sub>50</sub>, o que fatalmente resultaria em remédios com grande massa de princípio ativo (na ordem de centenas a milhares de miligramas), na formulação do fármaco.

A molécula foi considerada inativa (i) quando não apresentava atividade inibitória em concentrações inferiores a 280 µg/mL, ou até o seu limite de solubilidade.

Alguns compostos comercialmente disponíveis (**3**, **D-ribose** e **β-D-ribofuranose**) foram previamente testados frente a enzima alvo TcGAPDH, a fim de promover correlações entre esses substratos comerciais com os derivados apresentados nesta dissertação (Tabela 16).

Ao observar os resultados dos testes de inibição da enzima TcGAPDH glicossomial contidos na Tabela 16 para os compostos **3** e **D-ribose**, nota-se que estes compostos não mostraram qualquer inibição da enzima alvo. Da mesma forma, a **β-D-ribofuranose**, que por sua vez possui a posição 1- acetilada e as

posições 2-, 3-, 5- benzoiladas no anel ribosídeo, também não mostrou qualquer resultado positivo.



**Tabela 16 - Testes de inibição da enzima gGAPDH (*T. cruzi*) para os derivados de carboidratos comerciais.**

Composto	Inibição (%)
<b>D-ribose</b>	0
<b>3</b>	0
<b>β-D-ribofuranose</b>	0

Em seguida, foram realizados os testes biológicos dos derivados peracilados **35-40**. Nota-se, a partir dos resultados dos testes biológicos da Tabela 17 para as lactonas peraciladas **35-40**, que a substituição das hidroxilas por grupamentos acil contendo núcleos aromáticos substituídos, resultou na inibição da enzima.

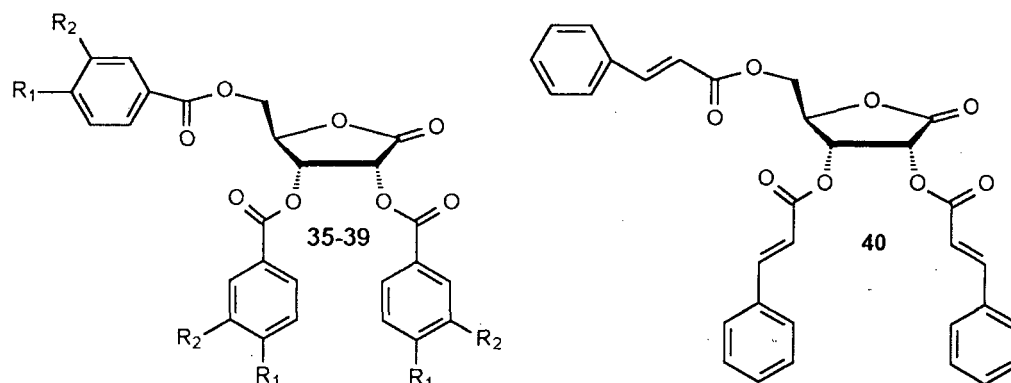
O composto tri-*p*-nitro benzoilado **36** demonstrou inibir a TcGAPDH na metade da concentração que foi necessária para a lactona **39**. Já o composto tri-*p*-clorobenzoilado **37** apresentou-se inativo, o que sugere a presença do cloro como sendo deletéria para a atividade inibitória.

O derivado **38** foi o único que teve seu valor de IC<sub>50</sub> determinado (IC<sub>50</sub>=255 μM), sendo este o que apresentou a maior inibição na menor concentração para todos os derivados de carboidratos sintetizados.

Como foi observado para a β-D-ribofuranose, o derivado tribenzoilado **35** também não apresentou inibição da TcGAPDH.

Como foi comentado na seção 2.1.1, não foi possível a purificação do composto **40**, uma vez que este sempre mostrava-se contaminado com ácido cinâmico. Mesmo estando impuro, o composto **40** apresentou uma considerável

inibição de TcGAPDH, indicando que a existência de um grupo espaçador entre a carbonila e o núcleo aromático pode fornecer resultados promissores de inibição.



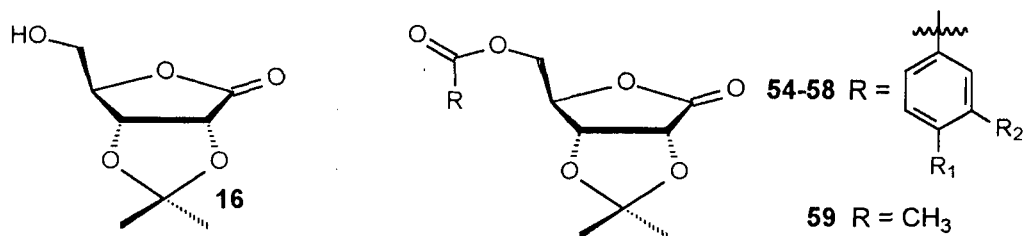
**Tabela 17 - Testes de inibição da enzima gGAPDH (*T. cruzi*) para os derivados de carboidratos 35-40.**

Peracilados Derivados				
Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Inibição (%)	Conc. (μM)
<b>35</b>	H	H	0	i
<b>36</b>	NO <sub>2</sub>	H	18	115
<b>37</b>	Cl	H	0	i
<b>38</b>	MeO	H	50	255
<b>39</b>	Cl	NO <sub>2</sub>	23	230
<b>40</b>	—	—	31	185

Os derivados 2,3-isopropilideno-5-acilados **54-59**, além de seu material de partida **16**, foram submetidos ao teste de inibição da enzima alvo.

Como pode ser observado na Tabela 18, os resultados de inibição enzimática foram baixos. Os únicos compostos que apresentaram atividade inibitória foram o 4'-nitrobenzoil derivado **55** e o 4'-cloro-3'-nitrobenzoil derivado **58**. Apesar da isopropilideno lactona **16** mostrar inibição, esta somente é ativa em concentrações muito elevadas.

A inatividade observada para os demais compostos indica a necessidade da presença de grupos aromáticos ligados às posições 2- e 3- da D-ribonolactona **3**. Como foi discutido anteriormente, esses compostos foram preparados e estão sendo submetidos aos testes.



**Tabela 18 - Testes de inibição da enzima gGAPDH (*T. cruzi*) para os derivados de carboidratos 16,54-59.**

2,3-isopropilideno Derivados				
Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Inibição (%)	Conc. (μM)
<b>16</b>	—	—	10	635
<b>54</b>	H	H	0	i
<b>55</b>	NO <sub>2</sub>	H	4	325
<b>56</b>	Cl	H	*	
<b>57</b>	MeO	H	0	i
<b>58</b>	Cl	NO <sub>2</sub>	20	215
<b>59</b>	—	—	*	

\* em fase de teste

Apesar de ter sido desenvolvida uma nova metodologia para preparação de derivados monoacilados na posição 5- da D-ribonolactona **3**, estes compostos não demonstraram bons resultados de inibição enzimática, como pode ser observado na Tabela 19.

Um fato interessante é que o composto 5-(4'-nitrobenzoil)-D-ribonolactona **61** praticamente não inibiu a enzima, levando a crer que a preparação de derivados mono-4'-nitrobenzoilados seletivamente substituídos nas posições 2- e 3-, e di-4'-nitrobenzoil substituídos nestas mesmas posições, poderiam levar a valores de IC<sub>50</sub> melhores.

A inatividade destes compostos corrobora com a afirmação de haver a necessidade da presença de núcleos aromáticos ligados às posições 2- e 3- da D-ribonolactona **3**.

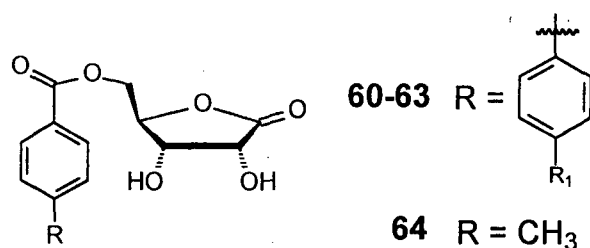


Tabela 19 - Testes de inibição da enzima gGAPDH (*T. cruzi*) para os derivados de carboidratos 60-64.

Composto	R <sub>1</sub>	Inibição (%)	Conc. (μM)
60	H	0	i
61	NO <sub>2</sub>	8	335
62	Cl	0	i
63	MeO	0	i
64	—	0	i

Finalmente, foram realizados os ensaios biológicos para as δ-lactonas contendo o grupo benzilideno acetal nas posições 3- e 4-. Assim como os demais derivados sintetizados, os compostos **24**, **67**, **87-89** também demonstraram baixos a moderados resultados de atividade inibitória (Tabela 20). Percebe-se, novamente, que a lactona benzoilada **67** mostrou-se inativo, enquanto que os derivados 4'-nitrobenzoil **87** e 4'-metoxibenzoil **88**, ofereceram os melhores valores de inibição enzimática.

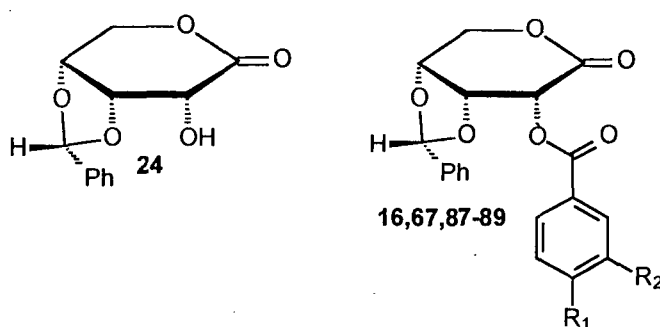


Tabela 1 - Testes de inibição da enzima gGAPDH (*T. cruzi*) para os derivados de carboidratos.

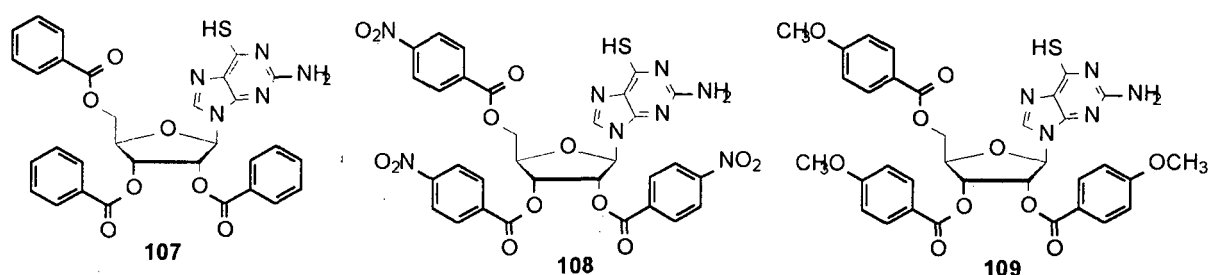
3,4-benzilideno Derivados				
Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Inibição (%)	Conc. (μM)
24	—	—	*	
67	H	H	0	i
87	NO <sub>2</sub>	H	7	255
88	MeO	H	8	350
89	Cl	NO <sub>2</sub>	*	

\* em fase de teste

Como complemento aos estudos realizados com os derivados de carboidratos, sintetizou-se um conjunto de derivados de nucleosídeos visando a obtenção de melhores resultados de IC<sub>50</sub>, baseado em estudos de inibição enzimática realizados para alguns compostos desta classe de compostos.<sup>18</sup>

Os nucleosídeos apresentados abaixo (derivados triacilados da tioguanosina) foram preparados através do tratamento da tioguanosina com ArCOCl/Py.<sup>63</sup> Porém, foram encontradas dificuldades nas suas purificações, e portanto, esses compostos ainda encontram-se contaminados com sub-produtos da reação, mesmo após inúmeras tentativas de recristalizações.

Percebe-se, através da inspeção dos dados contidos na Tabela 21, que mesmo impuros, os nucleosídeos derivados da tioguanosina demonstram melhores resultados de inibição da TcGAPDH.



**Tabela 21 - Testes de inibição da enzima gGAPDH (*T. cruzi*) para os derivados de nucleosídeos.**

Composto	Inibição (%)	Conc. (μM)
<b>107</b>	27	80
<b>108</b>	36	80
<b>109</b>	43	140

Apesar dos compostos peracilados terem apresentado os melhores resultados de inibição da enzima TcGAPDH entre a série de derivados de carboidratos, a atividade inibitória dos análogos de tioguanosina foram superiores.

Estes resultados de inibição da enzima alvo GAPDH indicam a necessidade da presença da base nitrogenada no anel ribosídeo. No entanto, cabe ressaltar que os derivados de carboidratos preparados neste trabalho são passíveis de sofrerem modificações em sua estrutura, visando a síntese de nucleosídeos através do acoplamento de bases nitrogenadas na posição 1-.<sup>35</sup>

Pelos resultados discutidos acima, pode-se concluir ainda, que a síntese de derivados de carboidratos seletivamente substituídos nas posições 2- e 3-, ou em ambas, utilizando grupamentos di-nitro-benzoatos e metoxi-nitro-benzoatos, poderiam fornecer compostos com melhor perfil de atividade inibitória da enzima TcGAPDH.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Instrumentação e reagentes

Os espectros de infra-vermelho foram obtidos em pastilha de KBr ou filme, em espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR 1600 com sistema de registro computadorizado, na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de RMN- $^1\text{H}$  e RMN- $^{13}\text{C}$  foram obtidos em aparelho RMN Bruker AC-200, em 200 e 50 MHz, respectivamente. Análises Elementares de CHN foram feitas em um Perkin Elmer 2400. A determinação do ponto de fusão das substâncias sólidas foi realizada em um aparelho Microquímica MQPF301.

Todos os solventes e reagentes empregados nas sínteses, caracterizações e ensaios biológicos foram adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Merck, Fluka, Mallinckrodt, Nuclear, Synth) e utilizados sem prévia purificação, com exceção dos cloretos de ácido e piridina, que foram tratados de acordo com procedimentos descritos na literatura.<sup>64</sup>



## 4.2 Sínteses dos derivados da D-ribolactona

### 4.2.1 Síntese dos derivados peracilados

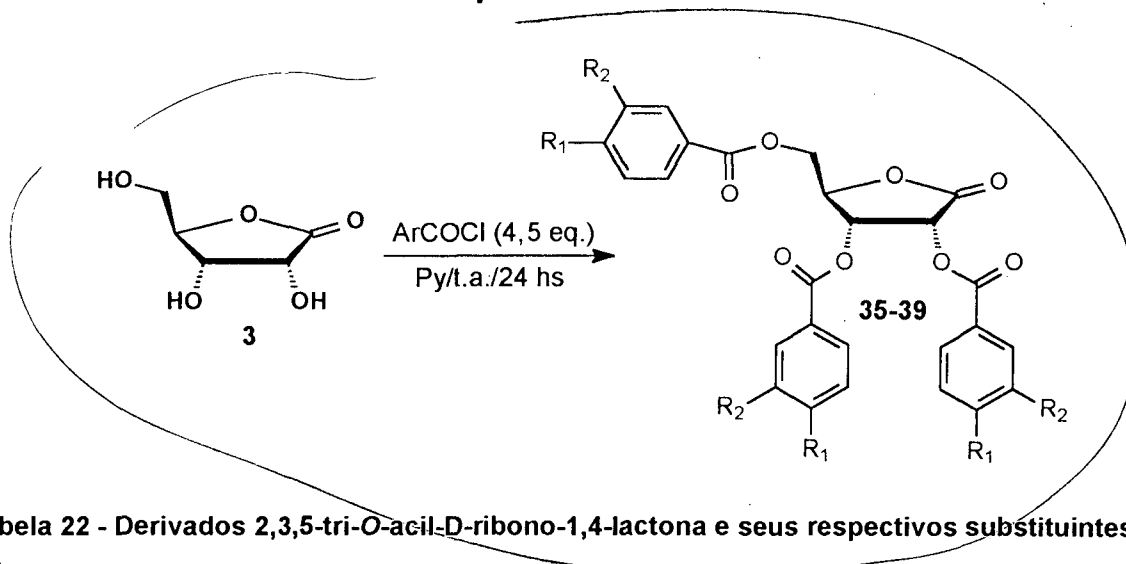


Tabela 22 - Derivados 2,3,5-tri-O-acil-D-ribono-1,4-lactona e seus respectivos substituintes R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
35	H	H
36	NO <sub>2</sub>	H
37	Cl	H
38	MeO	H
39	Cl	NO <sub>2</sub>

#### Procedimento para a síntese dos derivados 2,3,5-tri-O-acil-D-ribono-1,4-lactona

A uma solução formada por 0,33 mmol da D-ribono-1,4-lactona **3**, 0,5 mL de piridina anidra e 0,5 mL de CHCl<sub>3</sub>, protegida por um tubo secante de CaCl<sub>2</sub>, foram adicionados aproximadamente 1,5 mmol (4,5 mmol equivalentes) do respectivo cloreto de ácido, e deixados sob agitação, a temperatura ambiente, durante 24 horas. A solução foi então diluída em 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e lavada sucessivamente com 2 vezes de 20 mL HCl 5%, 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5% e 20 mL de H<sub>2</sub>O. Após secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporação do solvente orgânico, e coevaporação do resíduo formado por duas vezes com etanol, foram obtidos os seguintes compostos:

2,3,5-tri-O-Benzoil-D-ribono-1,4-lactona **35**: recristalização em acetona/etanol. Rend. 90%. P.f.=148 °C. (P.f.<sup>42</sup>=148 °C). IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1772 (C=O-lactona), 1722

(COOAr). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,65–4,90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,09 (m 1H, H-4), 5,94 (d, 1H, J=6,4 Hz, H-3), 6,18 (d, 1H, J=6,4 Hz, H-2), 7,30–8,15 (m, 15H, hidrogênios aromáticos).

2,3,5-tri-O-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona 36: recristalização em acetona. Rend. 95 %. P.f.= 165-166 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1810 (C=O-lactona), 1734 (COOAr); 1526 (NO<sub>2</sub>), 1354 (NO<sub>2</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,45 (m, 1H, H-4), 6,08 (d, 1H, J=6,2 Hz, H-3), 6,43 (d, 1H, J=6,2 Hz, H-2), 8,10–8,50 (m, 12H, hidrogênios aromáticos).

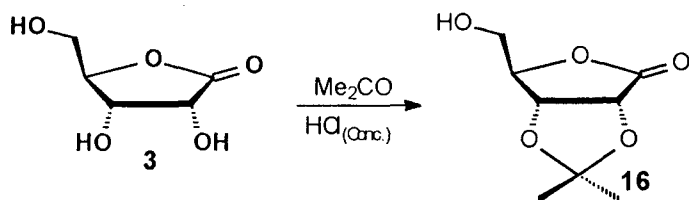
2,3,5-tri-O-(4'-clorobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona 37: recristalização em etanol. Rend. 90 %. P.f.= 148-149 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1788 (C=O-lactona), 1726 (COOAr). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,60–4,85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,07 (m, 1H, H-4), 5,92 (d, 1H, J=6,2 Hz, H-3), 6,13 (d, 1H, J=6,2 Hz, H-2), 7,33–8,08 (m, 12H, hidrogênios aromáticos). Anal. CHN calcd. para C<sub>26</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>8</sub> (%) C:55,39; H:3,04; exp. (%) C:55,53; H:3,09.

2,3,5-tri-O-(4'-metoxibenzoil)-D-ribono-1,4-lactona 38: recristalização em acetona/etanol. Rend. 92 %. P.f.= 113-116 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1784 (C=O-lactona), 1726 (COOAr), 1380 (CH<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 3,85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) 4,60–4,85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,04 (m, 1H, H-4), 5,88 (d, 1H, J=6,3 Hz, H-3), 6,13 (d, 1H, J=6,3 Hz, H-2), 6,75–7,05 (m, 6H, hidrogênios aromáticos), 7,78–8,10 (m, 6H, hidrogênios aromáticos). CHN calcd. para C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub> (%) C:63,27; H:4,76; exp. (%) C:63,25; H:4,84.

2,3,5-tri-O-(4'-cloro-3'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona 39: recristalização em etanol. Rend. 82 %. P.f.= 144-146 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1790 (C=O-lactona), 1732 (COOAr), 1536 (NO<sub>2</sub>), 1354 (NO<sub>2</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,70–4,95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,07 (m, 1H, H-4), 5,90 (d, 1H, J=6,3 Hz, H-3), 6,15 (d, 1H, J=6,3 Hz, H-2), 7,60–8,60 (m, 9H, hidrogênios aromáticos).

### 4.3 Síntese dos derivados acilados na posição 5-

#### 4.3.1 2,3-Isopropilideno-D-ribolactona 16



Uma solução contendo 4,00 g de D-ribono-1,4-lactona **3** (27,0 mmol), 160 mL de acetona e 1,6 mL de ácido clorídrico concentrado, protegida por um tubo secante de  $\text{CaCl}_2$  foi deixada, sob agitação a temperatura ambiente, por 18 horas. Após a remoção do solvente por evaporação, o óleo formado foi parcionado entre 200 mL de uma solução aquosa de  $\text{NaHCO}_3$  saturado e 150 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A fase aquosa foi extraída 3 vezes com 100 mL de diclorometano, as frações combinadas lavadas com 2 vezes 200 mL de brine (solução aquosa saturada de  $\text{NaCl}$ ), secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , o solvente evaporado, o resíduo coevaporado por duas vezes com etanol, e após recristalização em acetona/éter de petróleo forneceu 3,76 g (74% rend.) de 2,3-Isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **16**. Pf. 134 - 135 °C. (P. f. <sup>40,43</sup> = 138-139 °C). IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3470(-OH), 1772 (C=O-lactona), 1386 ( $\text{CH}_3$ ). RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,40 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 1,51 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 2,0–2,15 (m, 1H, -OH), 3,80 (dd, 1H,  $J$ = 1,5 e 3,7 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,98 (dd, 1H,  $J$ = 1,5 e 3,7 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 4,63 (s, 1H, H-4), 4,75–4,90 (m, 2H, H-2, H-3).

### 4.3.2 5-O-acil-2,3-isopropilideno-D-ribolactona

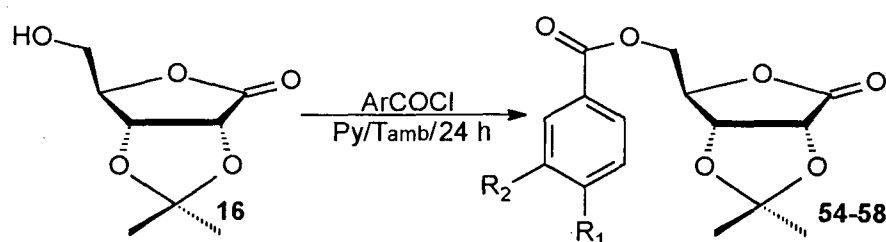


Tabela 23 - Derivados 5-O-acil-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona e seus respectivos substituintes R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>54</b>	H	H
<b>55</b>	NO <sub>2</sub>	H
<b>56</b>	Cl	H
<b>57</b>	MeO	H
<b>58</b>	Cl	NO <sub>2</sub>

Procedimento geral para a síntese geral dos derivados 5-O-acil-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **54-59**

A uma solução contendo 100 mg (0,54 mmol) do derivado 2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **16**, 1 mL de piridina anidra e 1 mL de CHCl<sub>3</sub>, protegida por um tubo secante de CaCl<sub>2</sub>, foram adicionados 0,80 mmol (1,5 mol equivalentes) do respectivo cloreto de ácido e deixados sob agitação a temperatura ambiente, durante 24 horas. A mistura reacional foi diluída em 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e, então, tratada sucessivamente com 2 vezes com 20 mL de HCl 5%, 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5% e 20 mL de H<sub>2</sub>O. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o solvente evaporado, o resíduo obtido foi coevaporado em etanol por duas vezes, e após recristalização foram obtidos os seguintes derivados:

5-O-benzoil-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **54**: recristalização em etanol. Rend. 99 %. P.f. = 98-99 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1788 (C=O-lactona), 1732 (COOAr), 1382

(CH<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,40 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1,51 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 4,48 (dd, 1H, J=2,0 e J= 13,3 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,63 (dd, 1H, J= 2,0 e J= 13,3 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,79 (m, 2H, H-2, H-3), 4,92 (t, 1H, J=2,0 Hz, H-4), 7,48 (t, 2H, 8,6 Hz, H-3'), 7,63 (t, 1H, J=8,6 Hz, H-4'), 7,95 (d, 2H, 8,6 Hz, H-2'). Anal. CHN calcd. para C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> (%) C:61,64; H:5,52; exp.(%) C:62,22; H:5,60.

2,3-isopropilideno-5-O-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **55**: recristalização em acetona/etanol. Rend. 90 %. P.f.= 158-159 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1782 (C=O-lactona), 1740 (COOAr), 1532 (NO<sub>2</sub>), 1382 (CH<sub>3</sub>), 1354 (NO<sub>2</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,41 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1,52 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 4,63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,79 (m, 2H, H-2, H-3), 4,92 (m, 1H, H-4), 8,12 (d, 2H, J=8,9 Hz, H-2'), 8,32 (d, 2H, J=8,9 Hz, H-3'). Anal. CHN calcd. para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>8</sub> (%) C:55,39; H:3,04; N:4,15; exp.(%) C:55,53; H:3,09; N:4,30.

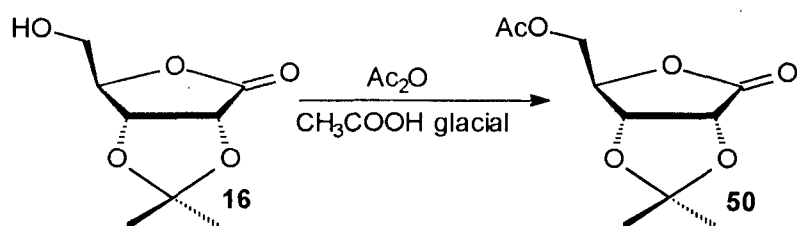
5-O-(4'-clorobenzoil)-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **56**: recristalização em acetato de etila/éter. Rend. 92 %. P.f.= 163 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1782 (C=O-lactona), 1726 (COOAr), 1384 (CH<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,40 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1,52 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 4,52 (dd, 1H, J=2,0 e J= 13,5 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,66 (dd, 1H, J=2,0 e J= 13,5 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,78 (m, 2H, J=2,0 Hz, H-2, H-3), 4,91 (t, 1H, J=2,0 Hz, H-4), 7,44 (d, 2H, J=8,8 Hz, H-3'), 7,88 (d, 2H, J=8,8 Hz, H-2').

2,3-Isopropilideno-5-O-(4'-metoxibenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **57**: recristalização em acetona/etanol. Rend. 99 %. P.f.= 99-102 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1782 (C=O-lactona), 1726 (COOAr), 1384 (CH<sub>3</sub>), 1170 (CH<sub>3</sub>O). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,38 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1,50 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 4,42 (dd, 1H, J=2,0 e J= 13,0 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,68 (dd, 1H, J=2,0 e J= 13,0 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,78 (m, 2H, H-2, H-3), 4,92 (t, 1H, J=2,0 Hz, H-4), 6,93 (d, 2H, J=8,1 Hz, H-3'), 7,87 (d, 1H, J=8,1 Hz, H-2').

5-O-(4'-cloro-3'-nitrobenzoil)-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **58**: recristalização em etanol. Rend. 80 %. P.f.= 87 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1796 (C=O-lactona), 1720 (COOAr), 1538 (NO<sub>2</sub>), 1380 (CH<sub>3</sub>), 1352 (NO<sub>2</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,40 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1,51 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 4,63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,78 (m, 2H, H-2, H-3),

4,91 (m, 1H, H-4), 7,69 (d, 1H, J=8,3 Hz, H-5'), 8,04 (d, 1H, J=8,3 Hz, H-6'), 8,45 (s, 1H, H-2').

#### Síntese do derivado 5-O-Acetil-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **59**



O derivado 5-O-acetil-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **59** foi preparado a partir de procedimento descrito na literatura,<sup>45</sup> pelo tratamento de **16** com  $\text{Ac}_2\text{O}$  e  $\text{AcOH}$ . Rend. 90%. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) [ref.]<sup>45</sup> C=O: 1788 [1790] (C=O-lactona), 1760 [1760] ( $\text{COOCH}_3$ ), 1380 ( $\text{CH}_3$ ). RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CF}_3\text{COOD}$ )  $\delta$ : 1,60 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 1,68 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 2,33 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 3,80 (d, 1H, J= 10,0 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,98 (d, 1H, J= 13,0 Hz,  $\text{CH}_2$ ) 5,10–5,18 (m, 2H, H-2, H-3), 5,30 (m, 1H, H-4).

#### 4.3.3 5-O-acil-D-ribolactona

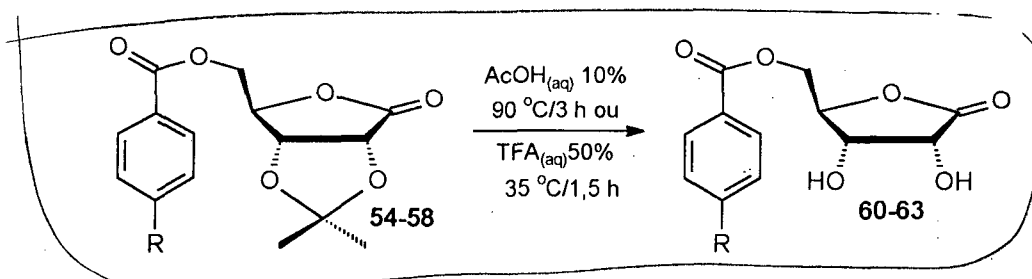


Tabela 24 - Derivados 5-O-acil-D-ribono-1,4-lactona 46-49 e seus substituintes R.

Composto	R
<b>60</b>	H
<b>61</b>	$\text{NO}_2$
<b>62</b>	Cl
<b>63</b>	$\text{CH}_3\text{O}$

## Síntese geral dos derivados 5-O-acil-D-ribono-1,4-lactona

### Método A

Uma solução formada por 0,40 mmol do respectivo 5-O-acil-D-ribono-1,4-lactona 60,62 e 1,5 mL de solução aquosa de ácido trifluoroacético 50% foi deixada, sob agitação, por 1,5 h, a temperatura de 35°C. Após a evaporação do solvente em evaporador rotatório, coevaporação do resíduo obtido em etanol por duas vezes, e recristalização foram obtidos as respectivas lactonas 5-substituídas:

### Método B

Uma solução formada por 0,40 mmol do respectivo 5-O-acil-D-ribono-1,4-lactona 61,63 e 1,5 mL de ácido acético 10% foi deixada sob agitação por 3 h, a temperatura de 90°C. Após a evaporação do solvente em evaporador rotatório, coevaporação do resíduo obtido em etanol por duas vezes, e recristalização em solventes adequados, foram obtidos as respectivas lactonas 5-substituídas:

5-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **60**: (método A) recristalização em clorofórmio/éter. Rend. 99 %. P.f.= 153-155 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3482, 3276 ( $-\text{OH}$ ), 1770 ( $\text{C}=\text{O}$ -lactona), 1716 ( $\text{COOAr}$ ). RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 4,26 (m, 1H, H-4), 4,46 (m, 3H, H-3,  $\text{CH}_2$ ), 4,58 (m, 1H, H-2, H-3), 5,64 (m, 1H,  $-\text{OH}$ ), 5,93 (m, 1H,  $-\text{OH}$ ), 7,53 (t, 2H,  $J=7,1$  Hz, H-3'), 7,68 (d, 1H,  $J=7,1$  Hz, H-4'), 7,95 (d, 2H,  $J=7,1$  Hz, H-2').

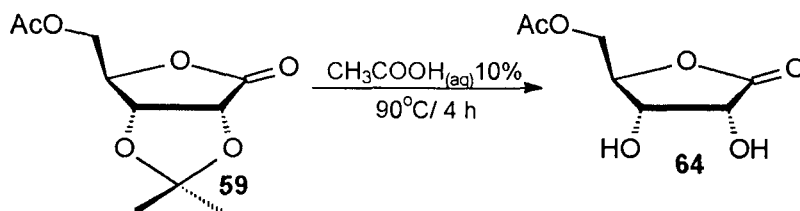
5-O-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **61**: (método B) recristalização em acetona/etanol. Rend. 65 %. P.f.= 176 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3480, 3332 ( $-\text{OH}$ ), 1766 ( $\text{C}=\text{O}$ -lactona), 1726 ( $\text{COOAr}$ ), 1544 ( $\text{NO}_2$ ), 1348 ( $\text{NO}_2$ ). RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 4,27 (m, 1H, H-4), 4,47 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,58 (m, 2H, H-2, H-3), 5,64 (m, 1H, m  $-\text{OH}$ ), 5,93 (m, 1H,  $-\text{OH}$ ), 8,18 (d, 2H,  $J=8,6$  Hz, H-2'), 8,37 (d, 2H,  $J=8,6$  Hz, H-3'). Anal. CHN calcd. para  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_8$  (%) C:48,49; H:3,72; N:4,71; exp. (%) C:48,60; H:3,81; N:4,81.

5-O-(4'-clorobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **62**: (método A) recristalização em acetona/etanol. Rend. 99 %. P.f.= 168-169°C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3392 ( $-\text{OH}$ ), 1768 ( $\text{C}=\text{O}$ -lactona), 1726 ( $\text{COOAr}$ ). RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 4,27 (m, 1H, H-4), 4,40-4,65 (m, 4H, H-2, H-3,  $\text{CH}_2$ ), 5,65 (s, 1H,  $-\text{OH}$ ), 5,93 (m, 1H,  $-\text{OH}$ ), 7,63 (d, 2H,  $J=8,4$  Hz, H-3'), 7,95 (d, 2H,  $J=8,4$  Hz, H-2').

5-O-(4'-metoxibenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **63**: (método B) recristalização em acetona/etanol. Rend. 54 %. P.f.= 150-151 °C. IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1760 ( $\text{C}=\text{O}$ -lactona), 1728 ( $\text{COOAr}$ ), 1382 ( $\text{CH}_3$ ), 1170  $\text{OCH}_3$ . RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 3,85 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 4,26 (m, 1H, H-4), 4,40-4,65 (m, 4H, H-2, H-3 e  $\text{CH}_2$ ), 5,61 (m, 1H,  $m-\text{OH}$ ), 5,92 (m, 1H,  $-\text{OH}$ ), 7,07 (d, 2H,  $J=8,5$  Hz, H-3'), 7,90 (d, 2H,  $J=7,1$  Hz, H-2'). Anal. CHN calcd. para  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_7$  (%) C:55,32; H:5,00 exp. (%) C:55,30; H:5,08.



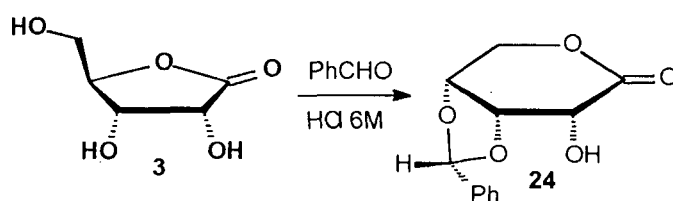
### Síntese do derivado 5-O-acetil-D-ribono-1,4-lactona **64**



Uma solução formada por 170 mg de 5-O-acetil-2,3-isopropilideno-D-ribono-1,4-lactona **59** (0,74 mmol) e 15 mL de ácido acético 10% foi deixada sob agitação por 4 h, a temperatura de 90°C. Após a evaporação do solvente em evaporador rotatório, coevaporação do resíduo em etanol por duas vezes, e recristalização em etanol, foram obtidos 110mg do composto 5-O-Acetil-D-ribono-1,4-lactona, 80% de rendimento. P.f. = 148,3 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) –OH: 3474, 3288; C=O: 1760 (lactona e Ac.); 1430, 1386 (NO<sub>2</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 2,04 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,10-4,55 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, CH<sub>2</sub>), 5,58 (m, 1H, –OH), 5,87 (m, 1H, –OH).

## 4.4 Acilações seletivas nas posições 2- e 3-

### 4.4.1 3,4-O-(*R*)-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona **24**



Uma solução contendo 440 mg (0,54 mmol) da D-ribono-1,4-lactona **3**, 4 mL de benzaldeído e 0,4 mL de HCl 6M foi deixada sob agitação durante 12 h, a temperatura ambiente. A solução foi filtrada, obtendo-se um sólido rosa que foi lavado sucessivamente com NaHCO<sub>3</sub> 5%, H<sub>2</sub>O e éter, até o desaparecimento desta coloração, fornecendo assim 0,60 g do composto 3,4-O-(*R*)-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona **24** (85% de rendimento). P.f. = 230 °C; P.f.<sup>25,41</sup> = 230-231,5 °C.

#### 4.4.2 2-O-acil-3,4-O-(*R*)-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona

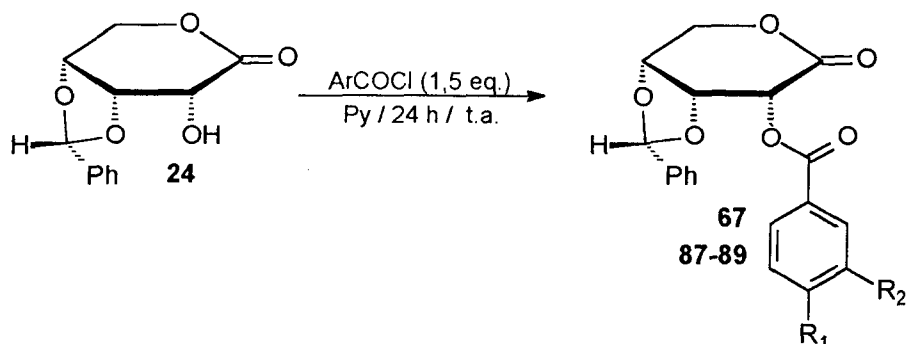


Tabela 25 - Derivados 2-O-acil-3,4-O-(*R*)-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona **77-80** e seus respectivos substituintes R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>67</b>	H	H
<b>87</b>	NO <sub>2</sub>	H
<b>88</b>	MeO	H
<b>89</b>	Cl	NO <sub>2</sub>

Procedimento para a síntese geral dos derivados 2-O-acil-3,4-O-(*R*)-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona **84-87**.

A uma solução contendo 200 mg (0,85 mmol) do derivado 3,4-O-(*R*)-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona **24**, 1,0 mL de piridina anidra e 1,0 mL de CHCl<sub>3</sub> protegida por um tubo secante de CaCl<sub>2</sub>, foram adicionados 0,80 mmol (1,5 mol equivalentes) do respectivo cloreto de ácido e a mistura final foi agitada a temperatura ambiente, durante 24 horas. A mistura reacional foi então diluída em 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e tratada sucessivamente com 2 x 30 mL HCl 5%, 30 mL NaHCO<sub>3</sub> 5% e 30 mL H<sub>2</sub>O. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o solvente evaporado, o material residual coevaporado duas vezes com etanol, e após recristalização foram obtidos os seguintes derivados:

3,4-O-(*R*)-benzilideno-2-O-benzoil-D-ribono-1,5-lactona **67**: recristalização em acetona/etanol. Rend. 90%. P.f. = 191 °C. IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) [ref.]<sup>44</sup> 1760 [1767] (C=O-lactona), 1740 [1740] (COOAr). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,43 (d, 1H, J=13,3 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,64 (d, 1H, J=13,3 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,74 (d, 1H, J=8,2 Hz, H-4), 4,97 (dd, 1H, J=1,5 e 8,2 Hz, H-3), 5,78 (d, 1H, J=1,5 Hz, H-2), 5,74 (s, 1H, CHPh), 7,40–7,63 (m, 8H, Bz),

8,15 (d, 2H,  $J=2,0$  Hz, Bz). Anal. CHN calcd. para  $C_{19}H_{16}O_6$  (%) C:67,06; H:4,74; exp.(%) C:66,77; H:4,74.

3,4-*O*-(*R*)-benzilideno-2-*O*-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,5-lactona **87**: recristalização em acetona/etanol. Rend. 80%. P.f.= 237-238 °C. IV (KBr,  $cm^{-1}$ ) C=O: 1772 (C=O-lactona), 1742 (COOAr); 1528 (NO<sub>2</sub>), 1346 (NO<sub>2</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 4,53 (d, 1H,  $J=13,1$  Hz, CH<sub>2</sub>), 4,75 (d, 1H,  $J=13,1$  Hz, CH<sub>2</sub>), 4,84 (d, 1H,  $J=8,2$  Hz, H-4), 4,97 (dd, 1H,  $J=1,5$  e 8,2 Hz, H-3), 5,87 (s, 1H, CHPh), 6,12 (d, 1H,  $J=1,5$  Hz, H-2), 7,44 (s, 5H, Ph), 8,23 (d, 2H,  $J=8,5$  Hz, H-2'), 8,38 (d, 2H, H-3').

3,4-*O*-(*R*)-benzilideno-2-*O*-(4'-metoxibenzoil)-D-ribono-1,5-lactona **88**: recristalização em acetona/etanol. Rend. 80%. P.f.= 159-161°C. IV (KBr,  $cm^{-1}$ ) 1756 (C=O-lactona), 1726 (COOAr); 1276 (=C-O-C). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3,85 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 4,43 (d, 1H,  $J=13,4$  Hz, CH<sub>2</sub>), 4,63 (d, 1H,  $J=13,4$  Hz, CH<sub>2</sub>), 4,74 (d, 1H,  $J=8,2$  Hz, H-4), 4,95 (dd, 1H,  $J=2,0$  e 8,2 Hz, H-3), 5,75 (d, 1H,  $J=2,0$  Hz, H-2), 5,83 (s, 1H, CHPh), 6,90 (d, 2H,  $J=8,9$  Hz, H-3'), 7,41 (m, 3H, Ph), 7,52 (m, 2H, Ph), 8,10 (d, 2H,  $J=8,9$  Hz, H-2).

3,4-*O*-(*R*)-benzilideno-2-*O*-(4'-Cloro-3'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,5-lactona **89**: recristalização em acetato de etila/éter. Rend. 70 %. P.f.= 216-217 °C. IV (KBr,  $cm^{-1}$ ) 1772 (C=O-lactona), 1734 (COOAr); 1540 (NO<sub>2</sub>), 1348 (NO<sub>2</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4,52 (d, 1H,  $J=13,2$  Hz, CH<sub>2</sub>), 4,77 (d, 1H,  $J=13,2$  Hz, CH<sub>2</sub>), 4,83 (d, 1H,  $J=8,2$  Hz, H-4), 5,02 (dd, 1H,  $J=1,5$  e 8,2 Hz, H-3), 5,86 (s, 1H, CHPh), 6,10 (d, 1H,  $J=1,5$  Hz, H-2), 7,44 (s, 5H, Ph), 7,96 (d, 1H,  $J=8,5$  Hz, H-4'), 8,23 (d, 1H,  $J=8,5$  Hz H-5'), 8,55 (s, 1H, H-2').

#### 4.4.2.1 2-O-acil e 3-O-acil-D-ribolactonas

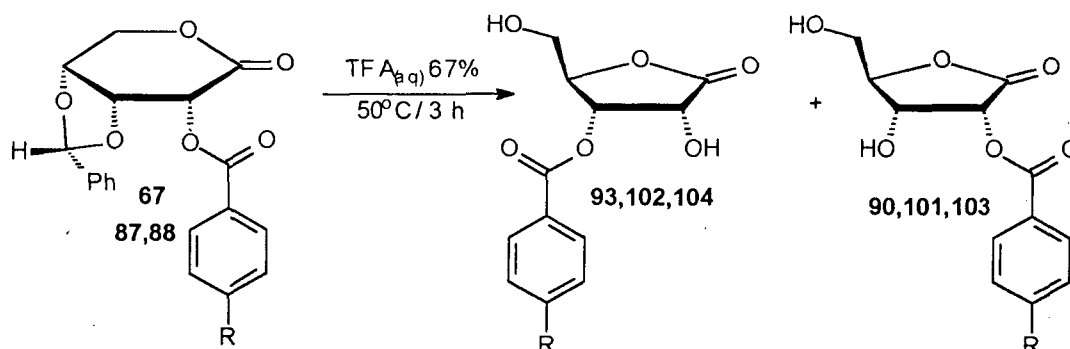


Tabela 26- Derivados 2-acil e 3-O-acil-D-ribono-1,4-lactona e seus respectivos substituintes R.

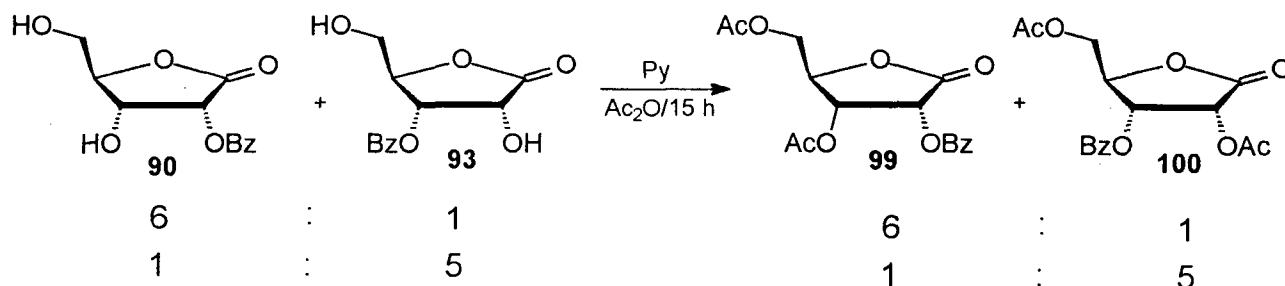
Composto	R <sub>1</sub>
<b>90,93</b>	H
<b>101,103</b>	NO <sub>2</sub>
<b>102,104</b>	CH <sub>3</sub> O

Procedimento para a síntese dos derivados 2-O-acil-D-ribono-1,4-lactona **90,101,102** e 3-O-acil-D-ribono-1,4-lactona **93,102,104**

Uma solução formada por 1,60 mmol do respectivo 2-O-acil-3,4-O-(R)-benzilideno-D-ribono-1,5-lactona **67,87** ou **88** e 4 mL de ácido trifluoroacético 67% foi deixada sob agitação por 3 h, a temperatura de 50°C. Após a evaporação do solvente em evaporador rotatório, e coevaporação do resíduo por duas vezes com etanol, o óleo obtido foi analisado por RMN-<sup>1</sup>H e IV sem maiores purificações, sendo então identificados por RMN-<sup>1</sup>H como uma mistura de isômeros **90,101,102** e **93,103,104**, respectivamente.

O produto obtido pela reação entre **67** e TFA 67% (cerca de 300 mg) foi cromatografado em 12 g de sílica gel com uma mistura acetato de etila/éter de petróleo 1:1 como eluente, e assim foram isoladas bandas enriquecidas dos isômeros 2-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **90** e 3-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **93**.

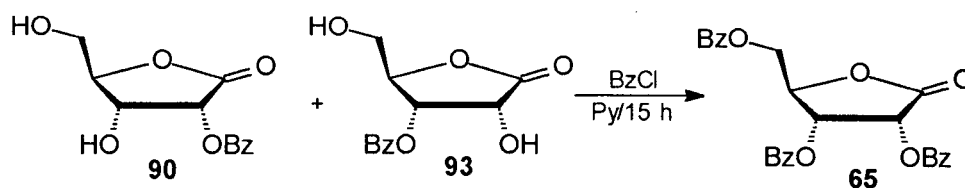
#### 4.4.2.1.1 2,5-di-O-acetil-3-O-benzoil e 3,5-di-O-acetil-2-O-benzoil-D-ribolactona



14 mg de uma mistura de **90/93** (6:1) foram deixadas reagir por 15 h com 0,02 mL de piridina anidra, 0,02 mL de anidrido acético e 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , protegida por um tubo secante de  $\text{CaCl}_2$ . A solução resultante foi então diluída em 15 mL de diclorometano e tratada sucessivamente com 2 vezes com 15 mL de HCl 5%, 15 mL de  $\text{NaHCO}_3$  5% e 15 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , o solvente evaporado, o resíduo coevaporado duas vezes com etanol, e assim foram obtidos os derivados 3,5-di-O-acetil-2-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **99** e 2,5-di-O-acetil-3-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **100** como um produto oleoso, numa proporção de 5:1.

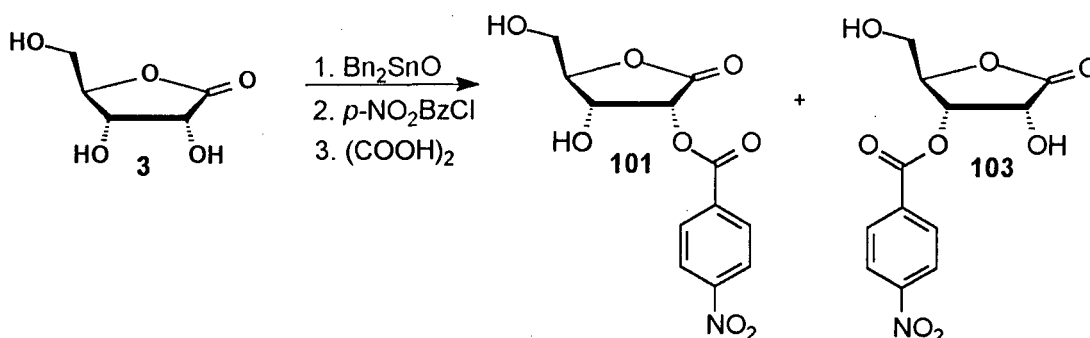
25 mg de uma mistura de **90/93** (1:5) foram deixadas reagir por 15 h com 0,04 mL de piridina anidra, 0,04 mL de anidrido acético e 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , protegida por um tubo secante de  $\text{CaCl}_2$ . A solução resultante foi então diluída em 15 mL de diclorometano e tratada sucessivamente com 2 x 15 mL HCl 5%, 15 mL  $\text{NaHCO}_3$  5% e 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , o solvente evaporado, o resíduo coevaporado duas vezes com etanol, e assim foram obtidos os derivados 2,5-di-O-acetil-3-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **99** e 3,5-di-O-acetil-2-O-benzoil-D-ribono-1,4-lactona **100** como um produto oleoso, numa proporção de 1:4.

#### 4.4.2.1.2 tri-O-benzoil a partir da mistura de isômeros 2-O-benzoil e 3-O-benzoil-D-ribolactona



20 mg de uma mistura de **90/93** (2:1) foram deixadas reagir por 15 h com 0,4 mL de piridina anidra, 0,05 mL de cloreto de benzoila (1 mmol) e 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> protegida por um tubo secante de CaCl<sub>2</sub>. A solução resultante foi então diluída em 15 mL de diclorometano e tratada sucessivamente com 2 vezes com 15 mL de HCl 5%, 15 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5% e 15 mL de H<sub>2</sub>O. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o solvente evaporado, o material residual coevaporado duas vezes com etanol, e assim foi obtido o derivado **35** como único produto, caracterizado por RMN-<sup>1</sup>H sem maiores purificações, e, então, comparado com a amostra autêntica, via perbenzoilação da D-ribonolactona **3**.

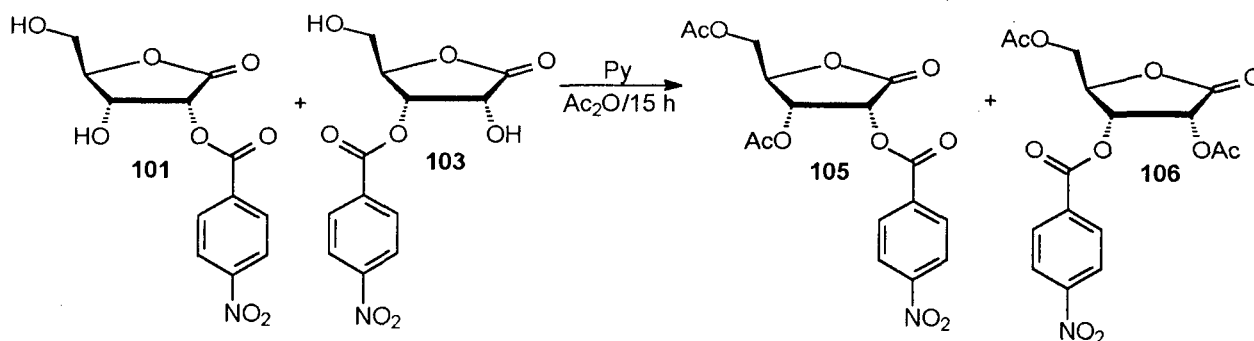
#### 4.5 Acilações seletivas nas posição 2' e 3' (Rota alternativa)



500 mg de D-ribono-1,4-lactona **3** (3,4 mmol) foram dissolvidos em 50 mL de tolueno, e então adicionados 880 mg de Bu<sub>2</sub>SnO (5 % mmol excesso). A solução foi deixada sob refluxo em Dean-Stark durante 10 h. Em seguida, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório, e então o resíduo foi redissolvido em 7 mL de CHCl<sub>3</sub>, a 25 °C. 630 mg de cloreto de p-nitrobenzoil (3,4 mmol) foram adicionados à solução e a mistura reacional deixada sob agitação durante 4 h, a temperatura

ambiente. Após remoção do solvente, a mistura foi dissolvida em 26 mL de CH<sub>3</sub>CN e em seguida adicionou-se 155 mg de ácido oxálico (1,69 mmol) a 25 °C, deixando a reação sob agitação por 20 h. A suspensão resultante foi filtrada em funil de Buchner, e o sólido lavado sucessivas vezes com acetona. O filtrado foi cromatografado em 12 g de sílica gel com uma mistura acetato de etila/éter de petróleo 1:1, como eluente, e assim foram obtidas misturas como um óleo amarelado, em diferentes proporções de 2-O-4'-Nitrobenzoil-D-ribono-1,4-lactona **101** e 3-O-4'-Nitrobenzoil-D-ribono-1,4-lactona **103**, 50 % rend.

#### 4.5.1 2,5-di-O-acetil-3-O-(4-nitrobenzoil) e 3,5-di-O-acetil-2-O-(4'-nitrobenzoil)-D-ribolactona



30 mg de uma mistura de **101/103** foram deixadas reagir por 15 h com 0,05 mL de piridina anidra, 0,05 mL de anidrido acético e 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> protegida por um tubo secante de CaCl<sub>2</sub>. A solução resultante foi então diluída em 15 mL de diclorometano e tratada sucessivamente com 2 x 15 mL HCl 5%, 15 mL NaHCO<sub>3</sub> 5% e 15 mL H<sub>2</sub>O. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o solvente evaporado, o material residual coevaporado duas vezes com etanol, onde foram obtidos os derivados 3,5-di-O-acetil-2-O-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **105** e 2,5-di-O-acetil-3-O-(4'-nitrobenzoil)-D-ribono-1,4-lactona **106** como um produto oleoso, na mesma proporção do material de partida (5:1).

## 5 CONCLUSÃO

- 1) Foi desenvolvida uma nova metodologia para preparação de derivados da D-ribonolactona **3** seletivamente acilados na posição 5-, em três etapas, utilizando condições reacionais simples, reagentes baratos e acessíveis, e em bons rendimentos globais (35-55%).
- 2) Não é possível a partir da simples inspeção das bandas referentes a carbonila de 1,4- e 1,5-lactonas em espectros de infravermelho, identificar se o anel possui cinco ou seis membros, sendo necessário para tanto a determinação da estrutura cristalina destes compostos.
- 3) Devido a facilidade pela qual grupos acil podem rearranjar entre as posições 2- e 3- da D-ribonolactona, foram obtidas misturas isoméricas de compostos monoacilados nestas posições a partir da hidrólise ácida do grupo benzilideno de **67** e de um intermediário estanilado formada pela reação entre a D-ribonolactona e  $\text{Bn}_2\text{SnO}$ .
- 4) Estudos de RMN- $^1\text{H}$  para a hidrólise do grupo benzilideno de **67** e subsequente formação dos compostos 2-acilados e 3-acilados, indicou que a formação dos isômeros ocorre de maneira rápida. Notou-se, ainda, que a proporção isomérica é dependente da reatividade do grupo acil.



- 5) Foi desenvolvida uma rota alternativa para síntese dos compostos 2- e 3-acilados da D-ribonolactona **3**, a partir de um derivado estanilado.
- 6) Os derivados de carboidratos apresentados nesta dissertação mostraram atividades inibitórias baixas a moderadas, sendo que os compostos peracilados **35-40** foram os que demonstraram os melhores resultados de inibição de TcGAPDH.
- 7) Os derivados da tioguanosina mostrados neste trabalho forneceram valores de inibição consideravelmente maiores do que os derivados de carboidratos, indicando a necessidade da presença da base nitrogenada no anel ribosídeo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Veronesi, R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*; 8a ed.: Rio de Janeiro, 1991.
- (2) Mengel, J. O.; Rossi, M. A. *Amm. Heart J* **1992**, 124, 1052.
- (3) Tanowitz, H. B.; Kirchhoff, L. V.; Simon, D.; Morris, S. A.; Weiss, L. W.; Wittner, M. *Clin. Microb. Rev.* **1992**, 5, 400-419.
- (4) Verlinde, C. L. M. J.; Merrit, E. A.; Van Den Akker, F.; Kim, H.; Feil, I.; Delboni, L. F.; Mande, S. C.; Sarfaty, S.; Petra, P. H.; Hol, W. G. J. *Protein Science* **1994**, 3, 1670.
- (5) [www.who.ch/whosis/whosis.htm](http://www.who.ch/whosis/whosis.htm)
- (6) Weekly Epidemiological Record, Geneva, 2000; p 10-12.
- (7) <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>
- (8) Souza, W.; Padrón, T. S. In *Ciência Hoje*, 1983; Vol. 4.
- (9) Kennedy, K. J.; Bressi, J. C.; Gelb, M. H. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 95-98.
- (10) Barreiro, E. J.; Rodrigues, C. R.; Albuquerque, M. G.; de Sant'Anna, C. M. R.; de Alencastro, R. B. *Química Nova* **1997**, 20, 300-310.
- (11) Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. *Química Nova* **2001**, 24, 105-111.
- (12) Aronov, A. M.; Suresh, S.; Buckner, F. S.; Voorhis, W. C. V.; Verlinde, C. L. M. J.; Opperdoes, F. R.; Hol, W. G. J.; Gelb, M. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 4273-4278.
- (13) Aronov, A. M.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J.; Gelb, M. H. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4790-4799.
- (14) Souza, D. H. F.; Garrat, R. C.; Araújo, A. P. U.; Guimarães, B. G.; Jesus, W. D. P.; Michels, P. A. M.; Hannaert, V.; Oliva, G. *FEBS Letters* **1998**, 424, 131-135.
- (15) Verlinde, C. L. M. J.; Callens, M.; Van Calenbergh, S.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P.; Hannaert, V.; Michels, P. A. M.; Opperdoes, F. R.; Hol, W. G. J. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3605-3613.
- (16) Van Calenbergh, S.; Christophe, L. M. J.; Verlinde, C. L. M. J.; Soenens, J.; de Bruyn, A.; Callens, M.; Blaton, N. M.; Peeters, O. M.; Rozenski, J.; Hol, W. G. J.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3838-3849.

- (17) Sá, M. M.; Dias, R. L. A.; Crisóstomo, F. R. P.; Corrêa, A. G.; Yonashiro, M.; Oliva, G. 22o Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Poços de Caldas, MG, 1999; p QO-125.
- (18) Sá, M. M.; Dias, R. L. A.; Vieira, P. C.; Oliva, G. 22o Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Poços de Caldas, MG, 1999; p MD-040.
- (19) A obtenção da enzima gGAPDH em quantidades suficientes para os testes de inibição é realizada a partir da sua expressão recombinante em uma cepa de *Escherichia coli*. Esse plasmídeo foi desenvolvido no Instituto Internacional de Patologia Molecular e Celular da Bélgica<sup>20</sup> e gentilmente cedido ao Laboratório de Cristalografia de Proteínas da Universidade de São Paulo em São Carlos (IFSC-USP), o qual tem realizado o processo de expressão da enzima de forma rotineira, com algumas modificações experimentais visando maior rendimento e pureza.
- (20) Hannaert, V.; Oppendoes, F. R.; Michels, P. A. M. *Prot. Exp. Purif.* **1995**, 6, 244.
- (21) Kathryn, K. M.; Wong, C.-H. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4465-4493.
- (22) Hollingsworth, R. I.; Wang, G. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4267-4282.
- (23) Bhat, K. L.; Chen, S.-Y.; Joullié, M. M. *Heterocycles* **1985**, 23, 691-729.
- (24) Lederkremer, R. M.; Varela, O. *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **1994**, 50, 125-209.
- (25) Chen, S.-Y.; Joullié, M. M. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 2168-2174.
- (26) Ortuño, R. M.; Alonso, D.; Font, J. *Tetrahedron Letters* **1986**, 27, 1079-1082.
- (27) Danilova, G. A.; Mel'nikova, V. I.; Pivnitsky, K. K. *Tetrahedron Letters* **1986**, 27, 2489-2492.
- (28) Camps, P.; Cardellach, J.; Font, J.; Ortuno, R. M.; Ponsati, O. *Tetrahedron* **1982**, 38, 2395-2402.
- (29) Suh, H.; Wilcox, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 470-481.
- (30) Comín, M. J.; Rodriguez, J. B. *Tetrahedron* **2000**, 56, 4639-4649.
- (31) Barton, D. H. R.; Benecchie, M.; Khuong-Huu, F.; Potier, P.; Reyna-Pinedo, V. *Tetrahedron Letters* **1982**, 23, 651-654.
- (32) Dho, J. C.; Fleet, G. W. J.; Peach, J. M.; Prout, K.; Smith, P. W. *Tetrahedron Letters* **1986**, 27, 3203-3204.
- (33) Baird, P. D.; Dho, J. C.; Fleet, G. W. J.; Peach, J. M.; Prout, K.; Smith, P. W. *J. Chem. Soc., Perkin I* **1987**, 1785-1791.
- (34) Bigham, E. C.; Gragg, C. E.; Hall, W. R.; Kelsey, J. E.; Mallory, W. R.; Richardson, D. C.; Benedict, C.; Ray, P. H. *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 717-726.

- (35) Howell, H. G.; Brodfuehrer, P. R.; Brundidge, S. P.; Benigni, D. A.; Sapino, C. J. *J. Org. Chem* **1988**, 53, 88-92.
- (36) Lundt, I.; Madsen, R. *Synthesis* **1992**, 1129-1132.
- (37) Csuk, R.; Kühn, M.; Ströhl, D. *Tetrahedron* **1997**, 53, 1311.
- (38) Barton, D. H. R.; Camara, J.; Cheng, X.; Géro, S. D.; Jaszberenyi, J. C.; Quiclet-Sire, B. *Tetrahedron* **1992**, 48, 9261-9276.
- (39) Bambury, R. E.; Feeley, D. T.; Lawton, G. C.; Weaver, J. M.; Wemple, J. *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 1613.
- (40) Rodriguez, J. B. *Tetrahedron* **1999**, 55, 2157-2170.
- (41) Zinner, H.; Voigh, H.; Voigh, J. *Carbohydr. Res.* **1968**, 7, 38-55.
- (42) Enholm, E. J.; Jiang, S.; Abboud, K. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 4061-4069.
- (43) Hough, L.; Jones, J. K. N.; Mitchell, D. L. *Can. J. Chem.* **1958**, 36, 1720-1728.
- (44) Baggett, N.; Buchanan, J. G.; Fatah, M. Y.; Lachut, C. H.; McCullough, K. J.; Webber, J. M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1826-1827.
- (45) Ogura, H.; Takahashi, H.; Itoh, T. *J. Org. Chem* **1972**, 37, 72-75.
- (46) Ariza, J.; Font, J.; Ortuno, R. M. *Tetrahedron Letters* **1991**, 32, 1979-1982.
- (47) Lipshutz, B. H.; Morey, M. C. *J. Org. Chem* **1981**, 46, 2419-2423.
- (48) Posner, G. H.; Oda, M. *Tetrahedron Letters* **1981**, 22, 5003-5006.
- (49) Rana, S. S.; Barlow, J. J.; Matta, K. L. *Tetrahedron Letters* **1981**, 22, 5007-5010.
- (50) Shah, R. H. *Carbohydr. Res.* **1986**, 155, 212-216.
- (51) Kold, H.; Lundt, I.; C., P. *Acta Chem. Scand.* **1994**, 48, 675-678.
- (52) Han, S.-Y.; Joullié, M. M.; Petasis, N. A.; Bigorra, J.; Corbera, J.; Font, J.; Ortuno, R. M. *Tetrahedron* **1993**, 49, 349-362.
- (53) Han, S.-Y.; Joullié, M. M.; Fokin, V. V.; Petasis, N. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 2535-2562.
- (54) Chen, M. S.; Joullié, M. M. *Tetrahedron Letters* **1983**, 24, 5027-5029.
- (55) Clode, D. M. *Chem. Rev.* **1979**, 79, 491-513.
- (56) Reginato, G.; Roelens, A. R.; Scapecchi, S. *J. Org. Chem* **1990**, 55, 5132-5139.
- (57) Greene, T. W.; Wuts, P. G. W. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Second ed.; John Wiley & Sons: New York, 1991.
- (58) Schachtner, J.; Stachel, H.-D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 3263-3276.
- (59) Sridhar, M.; Kumar, A.; Narender, R. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 2847-2850.
- (60) David, D.; Hanessian, S. *Tetrahedron* **1985**, 41, 643-663.

- (61) Wagner, D.; Verheyden, P. H.; Moffatt, J. G. *J. Org. Chem* **1974**, 39, 24-30.
- (62) Vieira, P. C.; Mafezoli, J.; Pupo, M. T.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Albuquerque, M. G.; Oliva, G.; Pavão, F. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 617-622.
- (63) Lewis, L. R.; Robins, R. K.; Cheng, C. C. *J. Org. Chem* **1964**, 7, 200-204.
- (64) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*; third ed.; Pergamon Press: New York, 1988.